

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio a corto y largo plazo de la melatonina y el 5-MCA-NAT como  
tratamiento en la hipertensión ocular y el glaucoma**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Fernando Huete Toral**

Director

**Jesús Pintor Just**

**Madrid, 2016**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

**ESTUDIO A CORTO Y LARGO PLAZO DE LA  
MELATONINA Y EL 5-MCA-NAT COMO  
TRATAMIENTO EN LA HIPERTENSIÓN OCULAR Y EL  
GLAUCOMA**

**TESIS DOCTORAL**

**Director:** Prof. Jesús Pintor Just

**Doctorando:** Fernando Huete Toral

**Madrid, 2015**

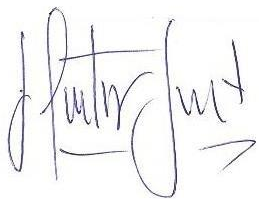


PROF. JESÚS PINTOR JUST, CATEDRÁTICO DEL DPTO. DE BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA QUE:

D. Fernando Huete Toral, licenciado en CC. Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la UCM, en la Facultad de Óptica y Optometría y bajo la dirección del que suscribe, el trabajo titulado "*Estudio a corto y largo plazo de la melatonina y el 5-MCA-NAT como tratamiento en la hipertension ocular y el glaucoma*", que cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Madrid, a 20 de octubre de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Pintor Just', with a stylized flourish at the end.

El Director de la Tesis Doctoral,

Dr. Jesús Pintor Just



*A mi pequeña Golondrina*



## AGRADECIMIENTOS

Soy consciente de que ésta es la primera parte que casi todo el mundo lee de una tesis, y que probablemente esta sea la parte más consultada de este trabajo; sin embargo es la última que escribo y la que más difícil me resulta de plasmar.

Son muchas las personas que han intervenido y alimentado este proyecto, a todas ellas muchas gracias. Al Prof. Jesús Pintor, excelentísimo Dr. Suso, gracias por la oportunidad, por la confianza, por el esfuerzo, por el cariño y por las sesiones de pizarra e hipótesis, sin duda alguna la parte más satisfactoria de este trabajo. Quizás mucha gente no me crea, pero la ciencia no se hace delante del microscopio, se hace en la cafetería, en la puerta de la facultad con un cigarro y delante de una vieja pizarra con rotuladores demasiado gastados.

Muchas gracias a todos los que han compartido conmigo esa pizarra, a Alba, a María, a Alex, a Bego, a Javier, a Hannan, a Sunti y a Gonzalo. Gracias por vuestro trabajo, por las risas, por el sudor y a veces la desesperación. Muchas gracias Alba por todas las tardes de tediosas inmunos, por esas alegres mañanas de disección de gelatinosos ojos y por todo.

Muchas gracias Almudena, sin ti este trabajo sería huérfano, y aún estaría en pañales. Muchas gracias por tu dedicación y tu esfuerzo, pero sobre todo gracias por todo lo demás, por el café de la mañana y por todo aquello que nos es intangible pero real.

Muchas gracias Basilio, ortodoxo faro de la realidad cuando el resto de la tierra tiende a temblar. Sin ninguna duda el lugar de trabajo se convierte en un sitio mejor y más divertido cuando lo comparto con vosotros.

Gracias a Pilar, pues éste no es más que la continuación de aquello que tú comenzaste, gracias a Jose Ignacio y a Jorge, cuya inspiración en la ciencia y la vida es contagiosa (suerte con la lectura de vuestras tesis) y gracias a Elena, a Cruz y a todos los que compartieron conmigo el principio del camino.

Gracias a mis padres y a mis hermanos y a toda mi familia.

Por encima de todo, gracias Tania, cada día gracias. Gracias por estar y todo lo que implica. Gracias Ainara, por ser y por cada sonrisa.



# Índice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	14
<b>RESUMEN</b> .....	20
<b>SUMMARY</b> .....	23
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	28
<b>1. EL GLOBO OCULAR</b> .....	28
1.1 CARACTERISTICAS Y ESTRUCTURAS.....	28
1.2 EL CUERPO CILIAR.....	30
1.2.1 Procesos ciliares.....	31
<b>2. EL HUMOR ACUOSO</b> .....	34
2.1 FORMACIÓN DEL HUMOR ACUOSO.....	36
2.1.1 Etapas en la formación del humor acuoso.....	40
1ª etapa: Captación de NaCl del estroma.....	40
2ª Etapa: trasvase EP-ENP.....	45
3ª Etapa: Secreción de NaCl en el Humor acuoso.....	47
2.2 DRENAJE DEL HUMOR ACUOSO.....	56
2.2.1 Vía Trabecular, Convencional o Presión Dependiente.....	57
2.2.2 Vía Uveoescleral, no Convencional o presión independiente.....	58
<b>3. LA PRESION INTRAOCULAR (PIO)</b> .....	58
3.1 REGULACION DE LA DINÁMICA DEL HUMOR ACUOSO.....	60
3.1.1 Sistema adrenérgico o simpático.....	61
3.1.2 Sistema colinérgico o parasimpático.....	66
3.1.3 Otros factores que influyen en la regulación del HA.....	68
<b>4. LA MELATONINA</b> .....	69
4.1 PRODUCCIÓN DE MELATONINA.....	71
4.1.1 Estructuras productoras de melatonina en el ojo.....	73
4.2 DEGRADACION DE LA MELATONINA.....	75
4.2.1 Metabolitos extrahepáticos de melatonina.....	76
4.3 RECEPTORES DE MELATONINA.....	78
4.3.1 Receptores nucleares.....	78
4.3.2 Receptores de membrana.....	79
4.4 MELATONINA Y 5-MCA-NAT. IMPLICACIONES EN LA PIO.....	93

<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	99
<b>III. RECOPIACIÓN DE ARTÍCULOS</b> .....	103
Efectos a corto plazo: Artículo 1 .....	104
Efectos a largo plazo: Artículo 2 .....	115
Efectos a largo plazo: Artículo 3 .....	122
Efectos a largo plazo: Artículo 4 .....	126
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	137
Efectos a corto plazo .....	139
Efectos a largo plazo .....	144
Discusión: Figuras.....	155
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	166
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	169
<b>ANEXOS</b> .....	197



## *Abreviaturas*

## ABREVIATURAS

4P-PDOT = 4-fenil-2-propioamidotetralina

5-MCA-NAT = 5-metoxi-carbonilamino-N-acetiltriptamina

6-OH-melatonina = 6-hidroximelatonina

A = Adrenalina

AA = Ácido araquidónico

AANAT = Arilalquilamino-N-acetiltransferasa

AC = Adenilato ciclasa

ADN = Ácido desoxirribonucleico

ADRA2A = receptor adrenérgico  $\alpha_{2A}$

ADRB2 = receptores adrenérgicos  $\beta_2$

AFMK = N1-acetil-N2-formil-metoxicinuramina

AMK = N-acetil-metoxicinuramina

AMPc = Adenosina monofosfato cíclico

ARN = Ácido ribonucleico

ARNm = ARN mensajero

ATP = Adenosina 5'-trifosfato

BSA = Albúmina sérica bovina

Bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{asa}}$  = Adenosin-trifosfatasa Na-K activada, ATPasa Na-K

$\text{Ca}^{2+}$  = Cation calcio

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  = concentración de calcio intracelular

CA = Anhidrasa carbónica

CaM = Calcio calmodulina

$\text{Cl}^-$  = Anión cloruro

$\text{Cl}^-_i$  = Cloruro intracelular

DAG = Diacilglicerol

DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol

DH-97 = N-pentanoil-2-benciltriptamina

DMA = Dimethylamiloride

D-MEM = Medio MEM modificado por Dulbeco

dNTPs = Desoxinucleótidos trifosfato

EPMA = Microanálisis mediante sonda de electrones

ENP = Epitelio no pigmentado

EP = Epitelio pigmentado

$F_{in}$  = Flujo de entrada

$F_{out}$  = Flujo de salida

$F_{trab}$  = Flujo de salida a través de vía trabecular

$F_u$  = Flujo de salida a través de vía uveal

FBS = Suero bovino fetal

FITC = Isotiocianato de fluoresceína

$F_{max}$  = Fluorescencia máxima, equivalente a la mínima  $[Cl^-]_i$

GC = Guanilato ciclasa

GPCRs = Familia de receptores acoplados a proteínas G

$H^+$  = Cation de hidrógeno (protón)

HA = Humor acuoso

$HCO_3^-$  = Bicarbonato

HIOMT = Hidroxiindol-O-metiltransferasa

IBMX = Isobutil metil xantina

IP3 = Inositol trifosfato

Isc = Corriente de cortocircuito

IUPHAR = International Union of Pharmacology

$K^+$  = Cation potasio

LOX = Lipooxigenasa

MEM = Medio esencial mínimo

MgCl<sub>2</sub> = Cloruro de magnesio

MQAE = Bromuro de N-(etoxicarbonilmetil)-6-metoxiquinolinio

MT<sub>1</sub> = Receptor de melatonina MT1

MT<sub>2</sub> = Receptor de melatonina MT2

MT<sub>3</sub> = Receptor de melatonina MT3

NA = Noradrenalina

Na<sup>+</sup> = Cation sodio

NaCl = Cloruro sódico

NO = Óxido nítrico

NOS = Óxido nítrico sintasa

NPY = Neuropeptido Y

NQO2 = QR2 = EC 1.10.99.2 = Quinona reductasa 2

P2Y<sub>2</sub> = Receptor purinergico metabotrópico 2

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

PFA = Paraformaldehido

PGE<sub>2</sub> = Prostaglandina E<sub>2</sub>

PI = fosfatidilinositol

PIO = Presión intraocular

P<sub>0</sub> = probabilidad de apertura

PKA = Proteína kinasa A

PKG = fosfokimasa G

PLA<sub>2</sub> = Fosfolipasa A<sub>2</sub>

PLC = Fosfolipasa C

PKC = Protein kinasa C

RT = Retrorranscripción

RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

SNC = Sistema nervioso central

SFK = Familia de kinasas Src

$t_{50}$  = tiempo transcurrido para la obtención de  $\frac{1}{2}$  Fmax

TNF $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

TRITC = Isotiocianato de tetrametil-rodamina

UV = Ultravioleta

(V) = Velocidad de de secreción, diferencial en la  $[Cl^-]_i$  por unidad de tiempo

VIP = Péptido intestinal vasoactivo

VMAT2 = Transportador vesicular de monoaminas de tipo 2



Resumen

## **RESUMEN**

El glaucoma engloba una serie de enfermedades que se caracterizan por la pérdida progresiva de las células ganglionares de la retina y la neuropatía del nervio óptico, que desencadenan finalmente una ceguera irreversible. La elevación de la presión intraocular (PIO) aparece como el principal desencadenante de esta patología en la mayoría de los casos, ya que produce una disminución del flujo sanguíneo hacia la retina y un aumento del estrés oxidativo. La estrategia terapéutica más común implica el uso de fármacos hipotensores, a menudo combinados, asociados a efectos no deseados.

En este marco, la melatonina y sus análogos, como el 5-MCA-NAT, surgen como alternativas a los fármacos ya existentes, por sus propiedades hipotensoras y antioxidantes y, en el caso del 5-MCA-NAT, por su posible acción a largo plazo. El objetivo de esta tesis es elucidar los mecanismos de la acción hipotensora aguda ya descrita para estos compuestos, determinando además el receptor y las vías de señalización implicadas en esta respuesta a corto plazo. En este mismo sentido nos proponemos confirmar la existencia de efectos hipotensores a largo plazo, analizando esta respuesta a diferentes fármacos y esclareciendo si ésta se debe a la capacidad de estos compuestos como modificadores de la expresión génica de enzimas o receptores implicados en la regulación de la PIO.

Mediante espectrofluorimetría con sonda MQAE sensible a  $\text{Cl}^-$ , hemos analizado la secreción de este ión en células no pigmentadas de proceso ciliar (NPE). La secreción de  $\text{Cl}^-$  ha sido descrita como el paso fundamental y limitante en la producción del HA, jugando por lo tanto un papel destacado en la regulación de la PIO. Nuestros resultados demuestran la capacidad de ambas sustancias para reducir la secreción de este ión en células NPE immortalizadas; no obstante la respuesta del 5-MCA-NAT es más potente y duradera que la obtenida en el caso de la melatonina. Además, esta respuesta presenta un comportamiento dosis-dependiente para ambas sustancias implicando la mediación de receptores o enzimas en esta regulación.

Hasta la fecha han sido descritos tres tipos de receptores de melatonina:  $MT_1$  y  $MT_2$ , que han sido clonados, y un receptor putativo denominado  $MT_3$ . Con objeto de elucidar que receptor es el implicado en nuestra respuesta se ensayaron diferentes antagonistas selectivos. Sorprendentemente, uno de los antagonistas selectivos del  $MT_2$  y un antagonista no selectivo potenciaron la acción de nuestros compuestos.

Descartados los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  estudiamos la implicación de receptor  $MT_3$ . En la actualidad existe una gran controversia sobre la identidad de este receptor. De forma clásica para este receptor ha sido descrito un agonista selectivo frente al  $MT_1$  y  $MT_2$ , el 5-MCA-NAT, y un antagonista selectivo, el prazosín. Al utilizar este compuesto, se constata una importante reversión de la acción de nuestros compuestos, lo que sugiere a este receptor como el mediador de esta acción.

La literatura actual expone la vía de la PKC/PLC como la vía de transducción de señales acoplada al  $MT_3$ . Nuestros resultados indican que esta vía no es la responsable de los efectos observados, sino que estos se dan por un aumento en las concentraciones citosólicas de  $AMP_c$ .

Además de los efectos hipotensores agudos, el 5-MCA-NAT proyecta su acción más allá de las 96 horas. Mediante qPCR hemos constatado que tanto la melatonina como el 5-MCA-NAT son capaces de reducir la transcripción de los genes que codifican las anhidrasas carbónicas CAII y CAXII, enzimas que regulan indirectamente la secreción de  $Cl^-$ ; sin embargo únicamente el 5-MCA-NAT consigue una reducción de CA XII más allá de las 72 horas. Esta disminución en los niveles de mensajero se traduce en una disminución de los niveles de enzima, medidos mediante inmunotinción, en modelo *in vitro* e *in vivo*.

En este mismo sentido, mediante tonometría, constatamos una potenciación en modelo *in vivo* de los efectos hipotensores del *Trusop*<sup>®</sup>, inhibidor de las CAs utilizado en el tratamiento del glaucoma, en conejos pretratados con una única dosis de 5-MCA-NAT.

Las CAs no son las únicas dianas de estas moléculas a nivel de regulación génica. Los datos recogidos señalan a los adrenoreceptores  $\alpha_{2A}$  (ADRA2A) y  $\beta_2$  (ADRB2), implicados en la regulación de la dinámica del humor acuoso, como dianas también de este efecto a largo plazo. Los estudios realizados *in vitro* muestran un aumento en los niveles de mensajero de los ADRA2A tras 48-72 horas del tratamiento con nuestros agonistas, y a las 24 horas en el caso de los ADRB2, manteniéndose más allá de las 72 horas. Estos cambios se traducen a nivel de proteína en ambos casos, no obstante en los ADRB2 ésta se da en una proporción inferior a la esperada. Este hecho queda respaldado por los datos obtenidos *in vivo*, donde la potenciación del efecto del timolol (betabloqueante antiglaucomatoso) es muy inferior al obtenido por la brimonidina (agonista de los ADRA2A). En este mismo sentido, los estudios de regulación génica *in vivo* a las 24 horas muestran los cambios esperados, sin embargo en éstos sólo los ADRA2A muestran cambios extremadamente significativos, y únicamente en el caso del pretratamiento con 5-MCA-NAT.

Nuestros resultados indican que la acción hipotensora de la melatonina y el 5-MCA-NAT se deben en su acción a corto plazo a una disminución aguda en la secreción de  $Cl^-$  de la células del ENP, lo que implica una disminución en la producción del HA y por lo tanto la PIO. Esta acción se establece a través de un receptor sensible al prazosín (clásicamente denominado  $MT_3$ ) y mediada por un aumento intracelular de  $AMP_c$ .

Ambos compuestos presentan además una acción a largo plazo fundamentada, al menos en parte, en la regulación génica de ADRA2A, ADRB2 y de las isoenzimas CA II y CA XII. Esta acción se traduce en fenómenos de potenciación de otros fármacos antihipertensivos mediante la utilización de una única dosis de nuestros compuestos y durante periodos superiores a 96 horas. Esta capacidad potenciadora junto con su capacidad hipotensora y antioxidante convierten a estas moléculas en potenciales fármacos para el tratamiento de la hipertensión ocular y el glaucoma.

## **SUMMARY**

Glaucoma is the term applied to a group of eye diseases characterized by progressive loss of retinal ganglion cell and optic nerve neuropathy and eventually triggers irreversible blindness. The elevated intraocular pressure (IOP) appears as the main feature for this disease in most of the cases, since it produces a reduction of blood flow to the retina and increased oxidative stress. Consequently the most common therapeutic strategy is based on the use of antihypertensive drugs, often in combination, but unfortunately associated with undesirable effects.

In this context, melatonin and its analogues, such as 5-MCA-NAT emerge as alternatives to the existing drugs, offering the advantage of hypotensive and antioxidant properties and in the case of 5-MCA-NAT, and providing potential long term action. The objective of this thesis is to elucidate the mechanisms of the acute hypotensive action, already described for these compounds and determining the receptor and signaling pathways involved in this short-term response. In addition we wish to confirm the existence of long term hypotensive effects, analyzing different drugs and clarifying whether this is a consequence of the ability of these compounds as modifiers of gene expression of enzymes or receptors involved in the regulation of IOP.

Using spectrofluorimetry with probe MQAE sensitive to  $\text{Cl}^-$ , we have analyzed the secretion of this ion in non-pigmented epithelial cells from the ciliary processes (NPE).  $\text{Cl}^-$  secretion has been described as the key rate-limiting step in the production of aqueous humor, thus playing an important role in the regulation of IOP. Our results demonstrate the ability of both substances to reduce the secretion of this ion in immortalized NPE cells; nevertheless the response of 5-MCA-NAT is more potent lasting more than that obtained in the case of melatonin. Besides, both present a dose-dependent involving in this regulation the action of receptors or enzymes.

To date there have been described three types of melatonin receptors: MT1 and MT2, which have been cloned, and a putative receptor called MT3. In order

to elucidate which receptor is involved in our response we tested different selective antagonists. Surprisingly, one of the selective MT<sub>2</sub> receptor antagonist and a nonselective one enhanced the action of our compounds.

Discarding the MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors we studied the involvement of MT<sub>3</sub> receptor. At the present time there is much controversy about the identity of this receptor. Conventionally it has been described a selective MT<sub>3</sub>-agonist versus MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub>, 5-MCA-NAT, and a selective antagonist for this receptor, prazosin. Using the latter, we observed a significant reversal in the action of our compounds, suggesting this receptor as the mediator of this action.

Existing literature states the PKC/PLC cascade as the transduction pathway coupled to MT<sub>3</sub>. Our results indicate that this pathway is not responsible for the observed effects, but these are the result of an increase in cytosolic levels of cAMP.

In addition to the acute hypotensive effects, 5-MCA-NAT projects its action for more than 96 hours. Using qPCR we found that both, melatonin and 5-MCA-NAT, are capable of reducing the transcription of genes encoding the CAII and CAXII carbonic anhydrase enzymes, which indirectly are regulating the Cl<sup>-</sup> secretion; however only 5-MCA-NAT achieves a CA XII reduction for more than 72 hours. This decrease in the messenger, results also in a reduction in enzyme levels, measured by immunostaining, *in vitro* and *in vivo* models.

In this sense, through tonometry, we see an enhancement in *in vivo* model of the hypotensive effects of *Trusop*<sup>®</sup>, which is a CAs inhibitor used in the treatment of glaucoma, in rabbits pretreated with a single dose of 5-MCA-NAT.

CAs are not the only targets of these molecules at the level of gene regulation. The collected data indicate the α<sub>2A</sub> (ADRA2A) and β<sub>2</sub> adrenoceptor (ADRB2), as long-term effect targets involved in the regulation of the aqueous humor dynamics. Studies *in vitro* show increased levels of the ADRA2A messenger after 48-72 hours of treatment with our agonists, and 24 hours in the case of ADRB2, retaining the effect for more than 72 hours. These changes are translated into protein level in both cases, but in the case of ADRB2 this is occurring in lower than expected proportion. This fact is supported by the data

obtained *in vivo*, where the potentiation of the effect of timolol (antiglaucomatous  $\beta$ -blocker) is much lower than that obtained by brimonidine (agonist of ADRA2A). In this sense, studies of *in vivo* gene regulation after 24 hours demonstrate the expected changes, however only in the case of ADRA2A showed extremely significant changes, and exclusively when they were pretreated with 5-MCA-NAT.

Our results indicate that the short-term hypotensive action of melatonin and 5-MCA-NAT leads to a sharp decrease in the secretion of  $\text{Cl}^-$  in NPE cells, implicating a decrease in aqueous humor production and therefore in the IOP. This action is established through a receptor sensitive to prazosin (conventionally called  $MT_3$ ) and mediated by an intracellular increase of the cAMP.

Both compounds present a long term action based, at least in part, on the CA II and CA XII and ADRA2A and ADRB2, isoenzymes and receptor gene regulation respectively. This action results in the potentiation of other antihypertensive drugs using a single dose of our compounds and for periods exceeding 96 hours. This potentiating capacity along with their hypotensive and antioxidant ability makes these molecules promising drugs for the treatment of ocular hypertension and glaucoma.



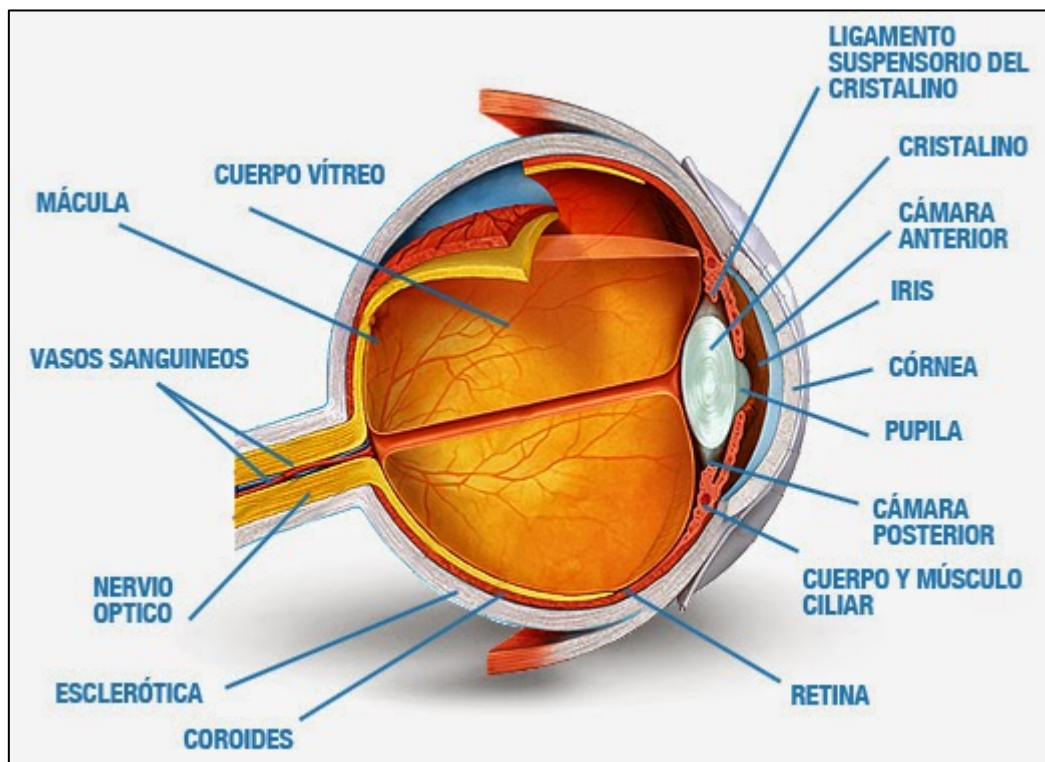
# 1. Introducción

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. EL GLOBO OCULAR

### 1.1 CARACTERÍSTICAS Y ESTRUCTURAS

El globo ocular es una estructura esférica que en humanos puede alcanzar un diámetro aproximado de 2.5 cm y un volumen de 6.5 ml. En esta estructura podemos diferenciar claramente una zona anterior, más curvada, llamada córnea y que abarca 1/6 de la circunferencia total y una zona posterior, llamada esclera o esclerótica, menos curvada, y que abarca los 5/6 restantes de la circunferencia del globo ocular (Forrester 2002) (Fig. I.1).



**Figura I.1. Corte sagital de ojo.**

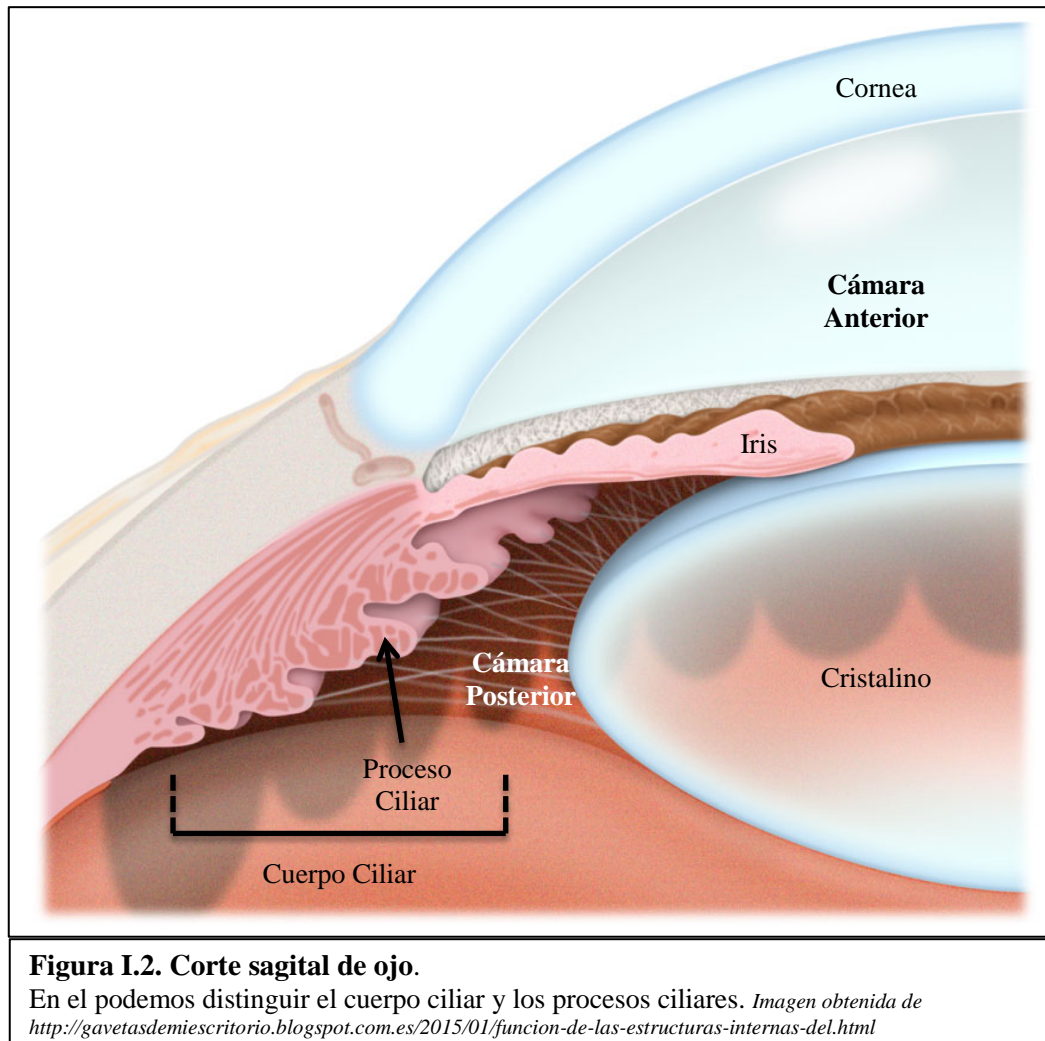
En el podemos distinguir las diferentes tunicas, estructuras internas y cámaras que delimitan. Imagen obtenida de <http://gavetasdemiescritorio.blogspot.com.es/2015/01/funcion-de-las-estructuras-internas-del.html>

El globo ocular está compuesto por tres capas o túnicas básicas. La más externa es la túnica fibrosa (cornoescleral), la capa intermedia llamada úvea o tracto uveal (compuesta por la coroides, el iris y el cuerpo ciliar) y la capa neural (retina), que es la más interna (Davson and Graham 1974). Estas tres capas sellan un espacio interior que contiene los medios transparentes: el humor acuoso, el cristalino y el cuerpo vítreo, siendo el cristalino el que separa ambos en cámaras independientes. Así mismo, el humor acuoso está contenido en dos cámaras (anterior y posterior) separadas por el iris (Fig. I.1 y Fig I.2). La capa externa más fibrosa, compuesta por la córnea, la esclera y la unión de ambas (limbo esclerocorneal), proporciona protección y apoyo estructural para el resto de estructuras intraoculares. (Forrester 2002).

La función del globo ocular está íntimamente relacionada con las células especializadas de la capa neural: los conos y bastones. Ambos tipos celulares son los encargados de la fotorrecepción, proceso por el cual la luz incidente sobre la retina es transformada en potenciales de acción que pueden ser enviados por el nervio óptico hacia el encéfalo donde se produce finalmente, el fenómeno de la visión (la Cour and Ehinger 2006). El resto de estructuras oculares, aunque secundarias a esta función, son necesarias para el correcto funcionamiento del sistema visual. Así, la córnea y el cristalino son imprescindibles para la transmisión y el correcto enfoque de la imagen en la retina, el iris y el cuerpo ciliar son necesarios para nutrir las estructuras avasculares intraoculares y junto con el sistema de drenaje del humor acuoso, dotan al ojo de un sistema hidrostático que mantiene su forma (Forrester 2002).

## 1.2 EL CUERPO CILIAR

El cuerpo ciliar es una estructura circular de 5 ó 6 mm de ancho, en forma de anillo que limita anteriormente con el iris, a la altura del espón escleral, y posteriormente con la *ora serrata*, y que continúa con la coroides.

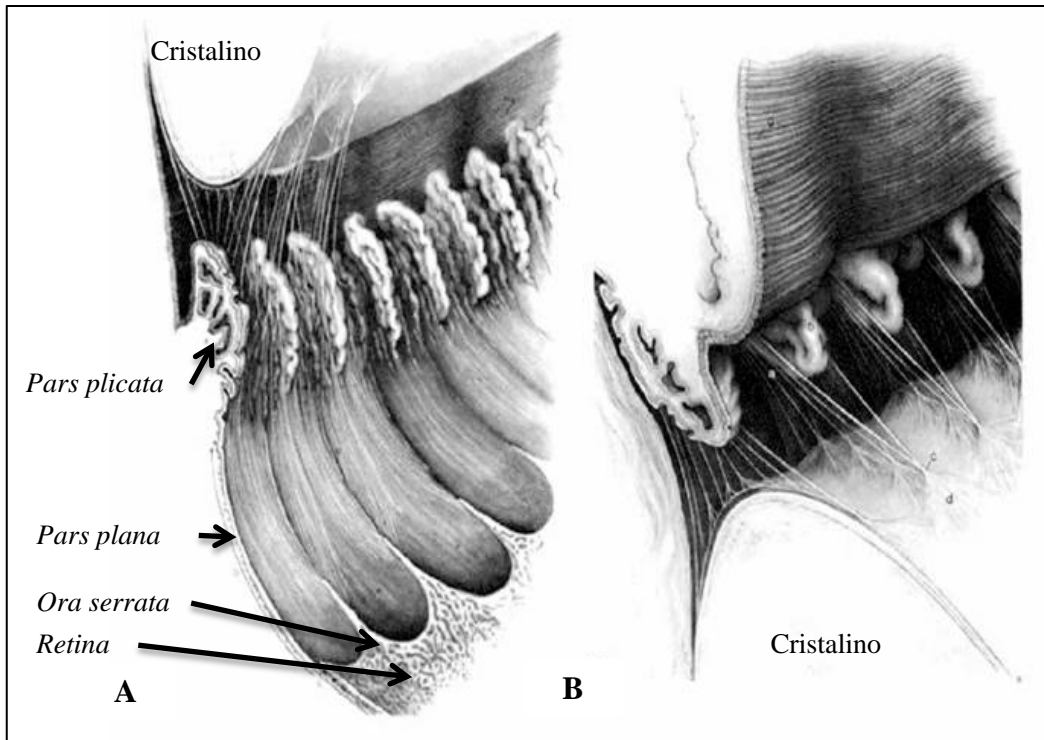


**Figura I.2. Corte sagital de ojo.**

En el podemos distinguir el cuerpo ciliar y los procesos ciliares. Imagen obtenida de <http://gavetasdemiescritorio.blogspot.com.es/2015/01/funcion-de-las-estructuras-internas-del.html>

El cuerpo ciliar se divide en dos zonas claramente diferenciadas; la *pars plana*, más posterior; y la *pars plicata*, que es la zona más anterior (Fig. I.3) (Glasser 2011).

La *pars plana* proporciona sostén estructural a la zona más anterior de la retina, la *ora serrata*, y se continúa posteriormente con la coroides. La *pars plicata*, comprende dos estructuras de funciones diferentes, el músculo ciliar, y los procesos ciliares (Fig. I.2) (Forrester 2002).



**Figura I.3. Procesos ciliares.**

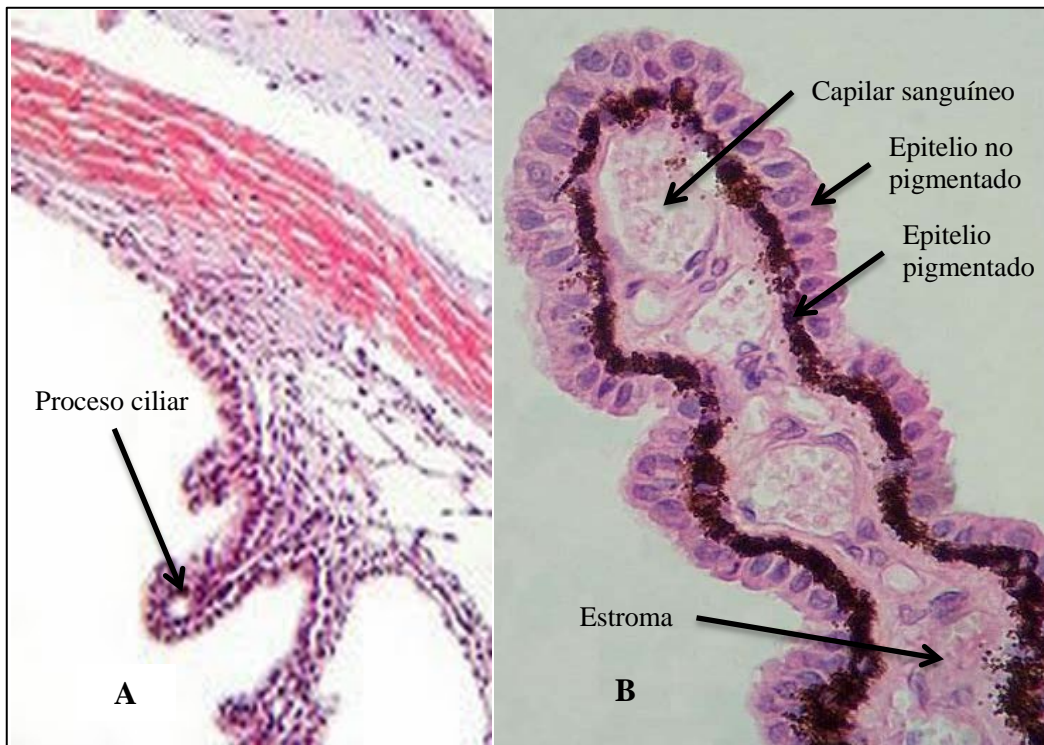
**A.** Vista posterior de los procesos ciliares. En él se distingue la *pars plana*, la *pars plicata*, la *ora serrata* y la inserción a la retina del cuerpo ciliar **B.** Vista anterior de los procesos ciliares y la inserciones al cristalino. *Imagen modificada de <http://intranet.tdmu.edu.ua/>*

El músculo ciliar controla la capacidad del cristalino para acomodar o enfocar la imagen sobre la retina. La contracción o relajación de este músculo se traduce en cambios de la forma y espesor de la lente cristalina, permitiendo cambios en la profundidad del enfoque de manera prácticamente instantánea (Delamere 2006).

### 1.2.1 Procesos ciliares

Los procesos ciliares se encuentran en la porción anterior de los cuerpos ciliares (*pars plicata*). Mediante un corte en la estructura podemos diferenciar tres capas claramente marcadas. La capa basal, compuesta por una intrincada y densa red vascular, una capa intermedia, el estroma, de tejido conectivo y la capa apical, denominada epitelio ciliar, que limita con la cámara posterior (Fig. I.4)

La vascularización de los procesos ciliares es muy compleja. Deriva de las arterias ciliares anteriores y posteriores. El retorno venoso se efectúa principalmente a través de la vena vórtex y de forma secundaria a través de las venas ciliares anteriores. La red capilar de la capa basal se extiende hasta la proximidad del epitelio ciliar.



**Figura I.4. Cuerpo ciliar, detalle procesos ciliares.**

**A.** Microscopia óptica de cuerpo ciliar x40. **B.** Microscopia óptica de procesos ciliares x100. Podemos distinguir el epitelio ciliar no pigmentado (ENP), el epitelio ciliar pigmentado (EP) y el estroma.

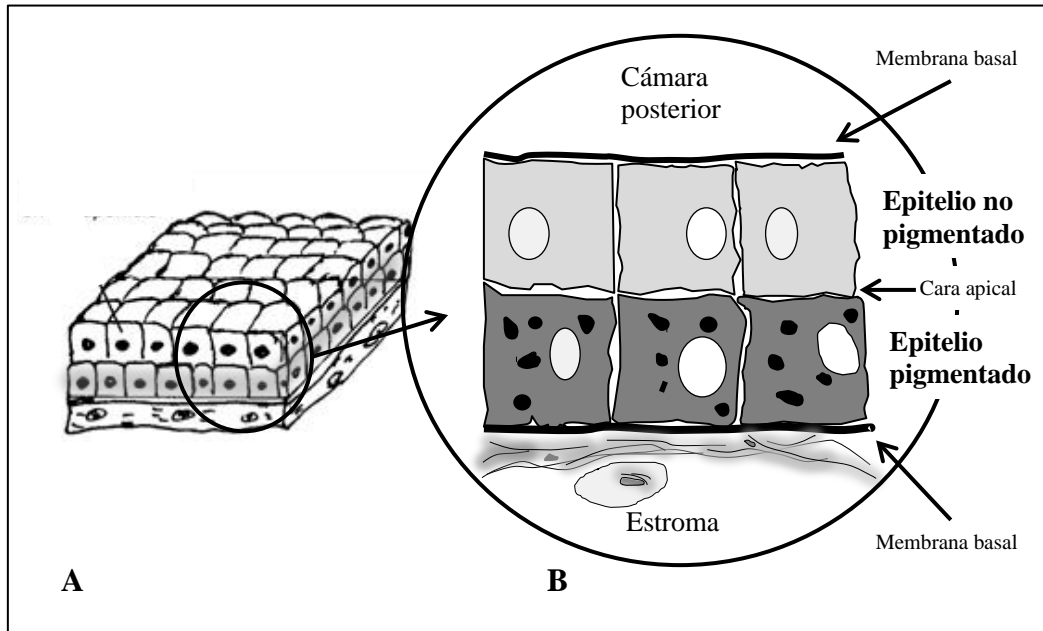
*Imagen modificada de <http://biologiadenos.blogspot.com/>*

Cerca del epitelio ciliar, los capilares, presentan un grosor disminuido, y un gran número de fenestraciones y poros. La capa de tejido conectivo laxo entre los capilares y los procesos es extremadamente fina.

Rodeando estos capilares, por debajo del epitelio ciliar, se haya una profusa inervación de terminales simpáticos y parasimpáticos, que también inervan el músculo ciliar. Existen también terminaciones libres en el epitelio ciliar (Morrison 1989) y una rica inervación sensorial procedente de los nervios nasociliares (Forrester 2002).

El epitelio ciliar es en realidad un doble epitelio cúbico; formado por un epitelio interno pigmentado (EP) y por un epitelio externo no pigmentado (ENP),

que establece la frontera con la cámara posterior (Fig. I.5). La disposición de este doble epitelio tiene la particularidad de que la zona apical de ambos tipos celulares se presenta de forma yuxtapuesta; exponiendo la cara basolateral hacia el exterior de la doble capa (Do and Civan 2004).



**Figura I.5. Procesos ciliares.**

**A.** Representación de epitelio cúbico doble de proceso ciliar. **B.** Detalle de corte transversal de proceso ciliar mostrando la disposición yuxtapuesta de las caras apicales del epitelio ciliar pigmentado y no pigmentado.

El EP es la continuación del epitelio retiniano. Está compuesto por células cúbicas con numerosos melanosomas, y escaso número de mitocondrias y de retículo endoplásmico rugoso.

El ENP está compuesto también por células cuboides. Estas células presentan un gran número de invaginaciones y pliegues hacia la cámara posterior, además de la existencia de una membrana basal, la membrana limitante interna. Existen otras interdigitaciones laterales, próximas a las cuales, pueden encontrarse la existencia de enzimas como la ATPasa Na-K (bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP<sub>asa</sub>) y la anhidrasa carbónica (CA), cuya presencia también se observa en la zona apical.

A diferencia de las células del EP, las células del ENP no presentan melanina, sin embargo la cantidad de mitocondrias y retículo endoplásmico

rugoso es muy superior en éstas. Este aumento es aún mayor en las células anteriores de la *pars plicata*; lo que es indicativo de un mayor ritmo metabólico.

La unión de las dos capas epiteliales se establece mediante desmosomas. Estas uniones son permeables, y permiten el tránsito de agua e iones entre los dos tipos celulares. Existen además uniones en hendidura (tipo *gap*), que regulan el transporte intercelular de pequeñas moléculas mediante la apertura de canales con diámetros aproximados de 1.5 nm. Esta circunstancia permite a los dos tipos histológicos trabajar como un sincito. (Raviola and Raviola 1978; Freddo 1987; Civan and Macknight 2004).

Cerca de la cara apical, las células del ENP, presentan uniones fuertes tipo *occludens*, formando un retículo sobre la superficie de cada célula. Estas uniones, junto a la membrana basal y la membrana limitante interna forman la llamada barrera hematoacuosa (Raviola 1974).

Debido a la gran permeabilidad de los capilares, y el escaso espesor del estroma, la barrera hematoacuosa impide el libre paso de sustancias desde los capilares hacia la cámara posterior y el humor acuoso. Esta función barrera, unida al funcionamiento como sincito del epitelio ciliar, hace que el transporte de sustancias hacia la cámara posterior y el humor acuoso, este altamente regulado.

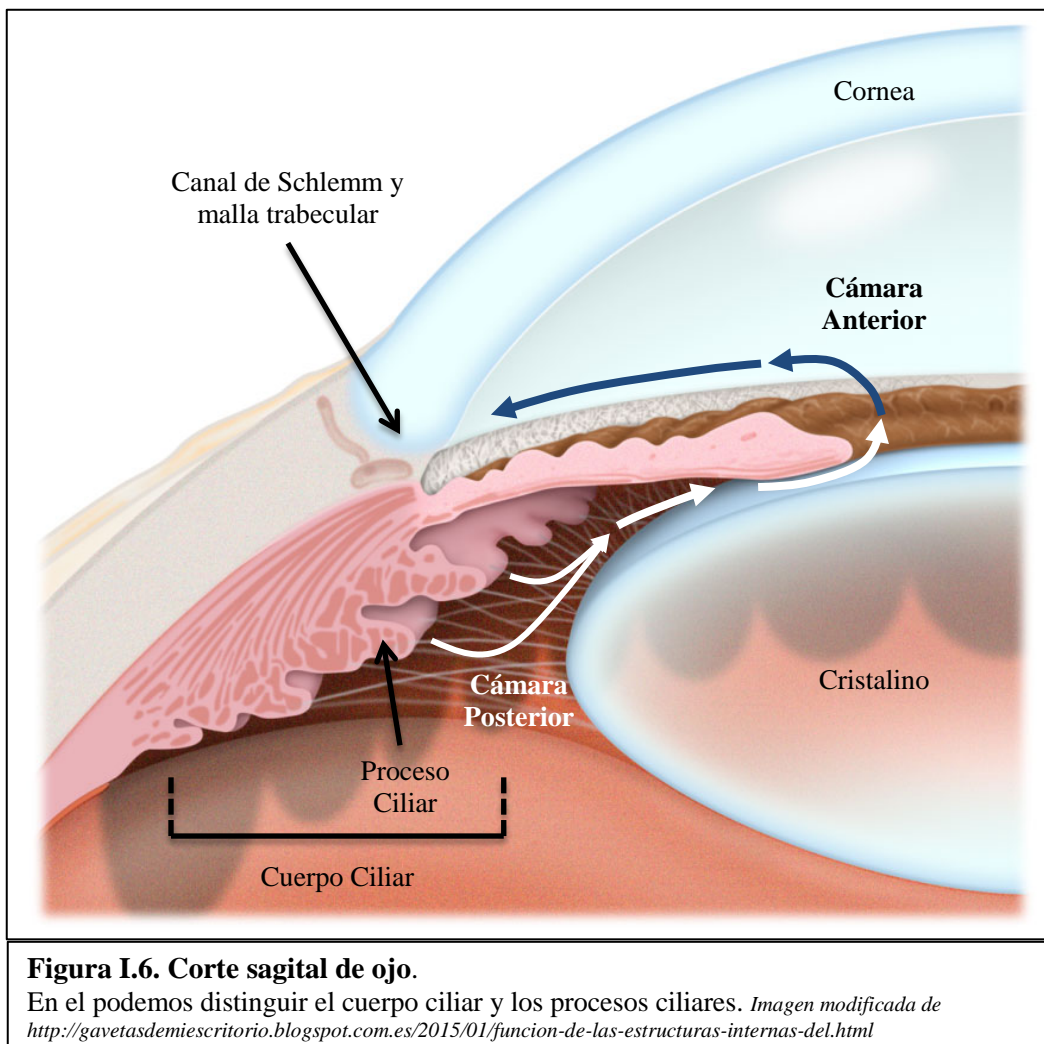
Los procesos ciliares, mediante el transporte específico de sustancias, son los encargados de la formación del humor acuoso. Este fluido transparente es fundamental para el mantenimiento de las estructuras oculares y su nutrición (Lens A 2008).

## 2. EL HUMOR ACUOSO

El humor acuoso (HA) es un fluido transparente, parecido al plasma sanguíneo, compuesto principalmente por agua, electrolitos y sustancias de bajo peso molecular. Su composición iónica varía entre las diferentes especies (Walker and Ellinwood 1933). Incorpora también algunas proteínas, principalmente albúmina, sin embargo su composición varía fundamentalmente

de la del plasma sanguíneo en algunos compuestos, y principalmente en la baja concentración proteica frente al plasma, unas quinientas veces inferior, y en la alta concentración de ascorbato, veinte veces superior al del plasma sanguíneo (Brubaker 1991).

Algunas estructuras intraoculares como el iris, el cristalino, y el endotelio corneal, contribuyen a la composición final del HA, sin embargo la formación del HA se da fundamentalmente como un proceso activo de secreción en los procesos ciliares (Forrester 2002).



Tras su secreción en los procesos ciliares hacia la cámara posterior, el HA circulará, a través de la pupila, hacia la cámara anterior, donde será drenado (Bill 1966) (Fig. I.6). El movimiento del HA de la cámara posterior a la cámara anterior está íntimamente relacionado con las funciones que desempeña entre las que destacan (Krupin 1995; Civan 1998):

- a. Proporcionar oxígeno y nutrientes a la córnea, el cristalino y la malla trabecular, y eliminar las sustancias de desecho del metabolismo celular.
- b. Mantener un cierto volumen, dotando al ojo de una presión intraocular (PIO) determinada, la cual es imprescindible para el correcto funcionamiento del sistema visual
- c. Transportar ácido ascórbico al segmento anterior, donde éste actúa como agente antioxidante eliminando los radicales libres.
- d. Facilitar la respuesta inmunitaria a nivel local durante un proceso inflamatorio.

El ojo humano tiene un volumen de HA de 250  $\mu$ l aproximadamente (Civan 1998), y el volumen medio que se forma por minuto es de 2,75  $\mu$ l (Brubaker 1991).

## 2.1 FORMACIÓN DEL HUMOR ACUOSO

La formación del HA es un proceso complejo en el cual los diferentes compuestos que lo forman son transferidos de forma regulada de la sangre hacia la cámara posterior. Este fenómeno tiene lugar principalmente en los procesos ciliares. En este sentido, podemos establecer tres etapas básicas en la formación del HA (Brubaker 1991):

- a. En primer lugar debe existir un flujo sanguíneo procedente de la vascularización de los procesos ciliares.
- b. Posteriormente, parte del plasma sanguíneo es ultrafiltrado, a través de los capilares fenestrados de los procesos ciliares, y pasa al interior de los espacios intersticiales entre los vasos y el epitelio ciliar.
- c. Gran parte del ultrafiltrado es trasvasado por el epitelio ciliar hacia la cámara posterior

El trasvase del ultrafiltrado a través del epitelio ciliar se produce mediante tres mecanismos interdependientes (Cole 1966; Cole 1977):

- a. Difusión, el cual se define como el movimiento pasivo de solutos a través del epitelio ciliar en respuesta a un gradiente de concentración.
- b. Ultrafiltración, el cual se define como el movimiento pasivo de agua y sustancias solubles en agua a través de las membranas celulares como resultado de las presiones hidrostática y oncótica entre el estroma ciliar y el HA.
- c. Transporte activo, el cual implica el movimiento de solutos a través del epitelio ciliar en contra de gradiente con consumo de energía; y que es el mecanismo mayoritario en la formación del HA.

La formación del humor acuoso es un proceso complejo, mediado principalmente por una secreción iónica activa a través del epitelio ciliar, desde el estroma hacia la cámara posterior; seguido por el movimiento osmótico del agua (Do and Civan 2004). Se ha especulado con la posibilidad de que el transporte de agua se efectúe de forma activa acoplado estequiométricamente a ciertos transportadores de membrana del tipo simporte (Loo, Zeuthen et al. 1996; Zeuthen, Meinild et al. 1997). Sin embargo, los trabajos publicados por Duquette et al en 2001 (Duquette, Bissonnette et al. 2001) y de Gagnon et al. de 2004 (Gagnon, Bissonnette et al. 2004), confirmaron el movimiento del agua mediante la formación de gradientes osmóticos.

La importancia de la secreción iónica, particularmente el transporte aniónico, para la formación del humor acuoso fue ya sugerida por Holland y Gipson en 1970 (Holland and Gipson 1970), al hallar una diferencia de potencial netamente negativa en la superficie en contacto con el HA de las células del ENP con respecto a la superficie estromal de las células del EP. Estos hallazgos fueron corroborados posteriormente por diferentes autores en diferentes especies (Watanabe and Saito 1978; Kishida, Sasabe et al. 1981;

lizuka, Kishida et al. 1984; Krupin, Reinach et al. 1984; Chu, Candia et al. 1987; Sears, Yamada et al. 1991; Do and To 2000).

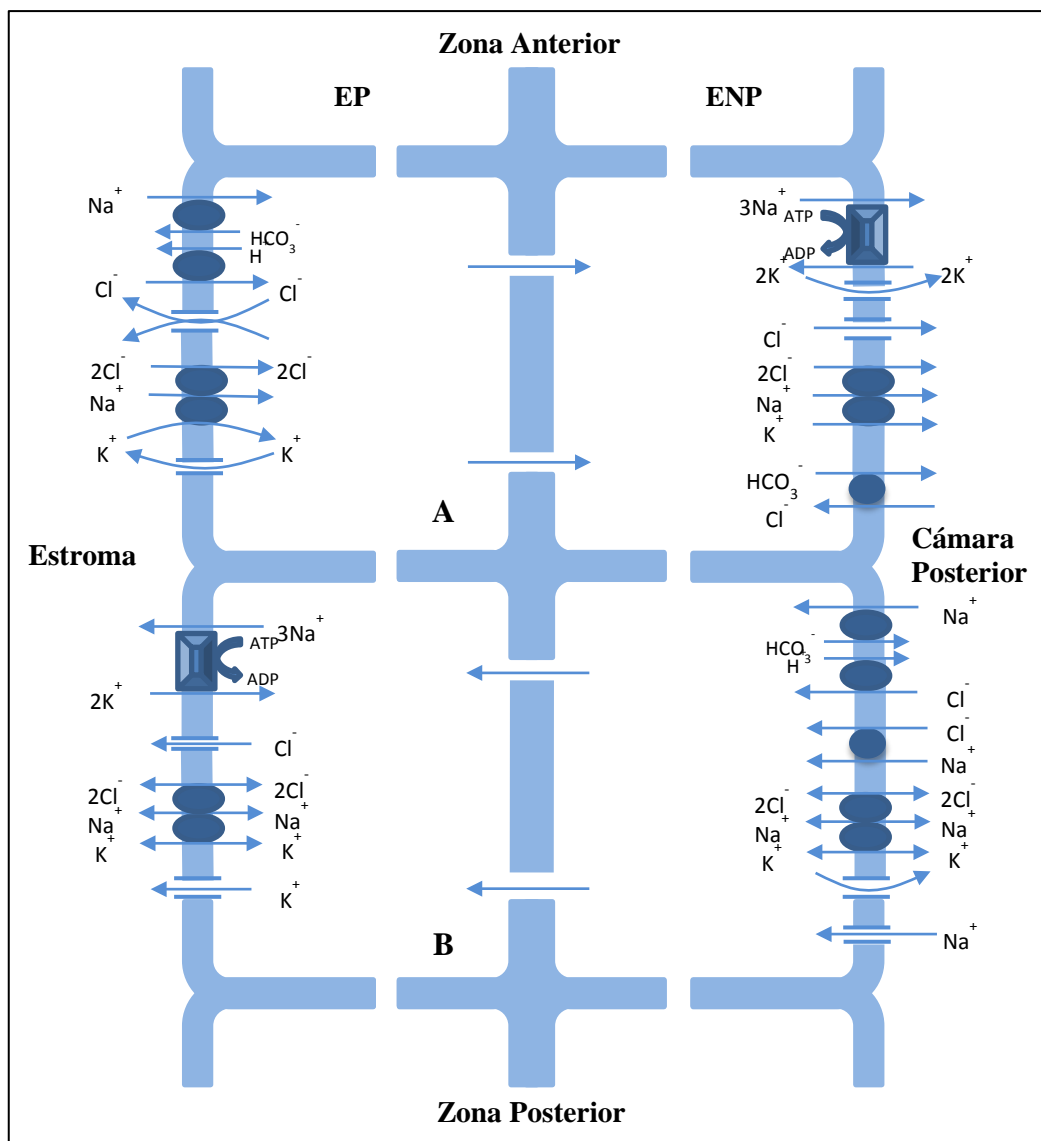
Inicialmente se consideró el ion bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) como el anión implicado en la secreción activa del epitelio ciliar. A ello contribuyó el hecho de ser secretado al HA en contra de gradiente en varias especies, incluyendo el conejo, modelo muy utilizado en estudios de dinámica del HA (H 1990). Otros hechos que apoyaban esta hipótesis se basaban en los experimentos de Kishida et al., (Kishida, Sasabe et al. 1981) y de Krupin et al (Krupin, Reinach et al. 1984), en los que el epitelio ciliar de conejo sumergido en fluido libre de  $\text{HCO}_3^-$  revertía su polaridad. La presencia de la anhidrasa carbónica (CA) activa (enzima que cataliza la formación de  $\text{HCO}_3^-$ ) en el epitelio ciliar (Lutjen-Drecoll and Lonnerholm 1981; Lutjen-Drecoll, Lonnerholm et al. 1983; Wu, Delamere et al. 1997) y la reducción en la producción de humor acuoso al tratar con un inhibidor de CA (acetazolamida) (Dailey, Brubaker et al. 1982; Rosenberg, Krupin et al. 1998) encajaban también en esta hipótesis.

Sin embargo, en la actualidad sabemos que el principal anión secretado al HA es el ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) (Civan 1998). De hecho, no existe una acumulación de  $\text{HCO}_3^-$  en HA humano, sino de  $\text{Cl}^-$  (H 1990); y el epitelio ciliar de otras especies, como el bobino, no revierten su polaridad al estar sumergido en medio libre de  $\text{HCO}_3^-$  (Do and To 2000) ni se ha conseguido detectar un flujo neto de  $\text{HCO}_3^-$  en procesos ciliares de dicha especie (To, Do et al. 2001). Dicho flujo si ha sido hallado para el ion  $\text{Cl}^-$ , confirmando en diversas especies la secreción de  $\text{Cl}^-$  a través del epitelio ciliar (Holland and Gipson 1970; Watanabe and Saito 1978; Kishida, Sasabe et al. 1982; Pesin and Candia 1982; Crook, Takahashi et al. 2000; Do and To 2000); por lo que el  $\text{HCO}_3^-$  aunque implicado en la formación de HA, actuaría como modulador de la secreción de  $\text{Cl}^-$ .

Al comparar las mediciones de flujo de  $\text{Cl}^-$  realizados mediante radioisótopos con las calculadas mediante corriente de cortocircuito ( $I_{sc}$ ), a través de diferencias de potencial (Kishida, Sasabe et al. 1982; Do and To 2000) se han observado discrepancias significativas. De hecho, los valores medidos mediante radioisótopos son superiores en un orden de magnitud a los

medidos mediante Isc. Estos datos sugieren que el  $\text{Cl}^-$  es secretado junto al ion sodio ( $\text{Na}^+$ ) (Do and Civan 2004).

Actualmente existe un modelo consensuado para la formación del HA que consta de tres etapas secuenciales en el cual el cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ) es captado del estroma por las células del EP, mediante transportadores electroneutros. Éste pasa de las células EP hacia las ENP a través de las uniones tipo gap, y finalmente es secretado a la cámara posterior con trasporte pasivo de agua, debido al gradiente osmótico (Fig. I.7).



**Figura I.7. Formación del humor acuoso. Diferencias en el eje antero-posterior en proceso ciliar**

**A.** Modelo de formación del humor acuoso hacia cámara posterior. Representación de canales y transportadores implicados. **B.** Modelo de reabsorción del humor acuoso. Representación de los canales potencialmente implicados en los procesos de reabsorción hacia estroma.

### 2.1.1 Etapas en la formación del humor acuoso

#### 1ª etapa: Captación de NaCl del estroma.

La absorción de  $\text{Cl}^-$  por parte de las células del EP se realiza en contra de gradiente electroquímico (Green, Bountra et al. 1985; Wiederholt and Zadunaisky 1986; Helbig, Korbmacher et al. 1989; Carre, Tang et al. 1992; Bowler, Peart et al. 1996). Mediante estudios de pH intracelular y radiomarcadores, se han propuesto dos mecanismos mayoritarios para la captación de NaCl (Wiederholt 1991): el simporte  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  sensible a bumetanida (Edelman, Sachs et al. 1994; To, Do et al. 2001), y los antiportadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (McLaughlin, Peart et al. 1998; To, Do et al. 2001).

Ambos mecanismos son operativos e independientes (Crook, Takahashi et al. 2000; Do and To 2000; To, Do et al. 2001; Shahidullah, Wilson et al. 2003), pudiendo funcionar de forma simultanea o no. La contribución en la captura de NaCl de cada uno de los mecanismos varía en función de las condiciones y la especie pero los antiportadores son los principales responsables de esta función.

#### **a) Cotransportador simporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$**

Este transportador ha sido hallado mediante inmunolocalización de forma muy intensa en la cara basolateral de las células PE en la *pars plicata* y de forma menos marcada en la *pars plana* de bovino (Dunn, Lytle et al. 2001). Mediante técnicas de inmunotransferencia se ha detectado una proporción diez veces mayor de este transportador en células EP que en células ENP de conejo (Crook, Takahashi et al. 2000).

La bumetanida (inhibidor selectico del simporte  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ ) ha demostrado ser efectiva inhibiendo la captación de  $^{22}\text{Na}$  y  $^{36}\text{Cl}$  en cultivos celulares de PE bovino (Helbig, Korbmacher et al. 1989). Además promueve el hipotonismo en

células nativas del EP de bovino, en condiciones isosmóticas (Edelman, Sachs et al. 1994).

Como era de esperar la bumetanida reduce también el transporte transepitelial y la formación del HA. Al ser incubada en la capa estromal inhibe tanto la corriente de cortocircuito ( $I_{sc}$ ) como la secreción neta de  $Cl^-$  a través del epitelio ciliar de conejo (Crook, Takahashi et al. 2000) y de bovino (Do and To 2000). En perfusión arterial en tejido aislado bovino, la bumetanida, disminuye el ritmo de secreción del humor acuoso (Shahidullah, Wilson et al. 2003).

Esta disminución en la secreción neta de  $Cl^-$  no responde sólo a una disminución en el trasvase de dicho ion desde la cara estromal a la cámara posterior, sino también a una potenciación del trasvase inverso, de cámara posterior hacia estroma (Crook, Takahashi et al. 2000; Do and To 2000). Aunque aún no está claro el motivo, puede deberse a un aumento de la reabsorción del ENP, provocado por la disminución de  $Cl^-$  intracelular (Matsui, Murakami et al. 1996; Civan, Peterson-Yantorno et al. 1997; Wu, Pierce et al. 1998; Dunn, Lytle et al. 2001), o por un aumento de la permeabilidad de las vías paracelulares debido a la bumetanida.

#### **b) Cotransportadores antiportes $Cl^-/HCO_3^-$ y $Na^+/H^+$ . Papel de las anhidrasas carbónicas**

Estos antiportadores juegan un papel importante tanto para la captación del  $Cl^-$ , como para el mantenimiento del pH intracelular. Esta doble función ya fue sugerida por Helbig et al. en 1989 y Wiederholt et al. en 1991 (Helbig, Korbmacher et al. 1989; Wiederholt 1991), en estudios sobre captación de  $^{22}Na$  y  $^{36}Cl$  en cultivos de células EP bovinas. Los estudios de Counillon et al. en 2000 (Counillon, Touret et al. 2000), sobre flujo de entrada de  $^{22}Na$  y mediciones de pH intracelular en cultivos de células PE bovinas, sirvieron para identificar el antiporte  $Na^+/H^+$  como la isoforma NHE-1. En este mismo estudio se identificó, mediante RT-PCR en humano, e inmunotinción en cultivos de PE bovino, el antiporte  $Cl^-/HCO_3^-$  como la isoforma AE2.

El recambio del sustrato metabólico de los antiportadores está catalizado por la CA. Como ya hemos visto esta enzima cataliza la formación de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$  a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La anhidrasa carbónica II (CAII) es citosólica y está unida tanto a NHE-1 (Li, Alvarez et al. 2002) como a AE2 (Sterling, Reithmeier et al. 2001), aumentando directamente la tasa de recambio de sustrato de ambos antiportes.

La anhidrasa carbónica IV (CA IV) está unida a membrana, y cataliza la reacción inversa, formación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , en la superficie estromal de las células del EP (Wu, Pierce et al. 1998). A pesar de que desconocemos los mecanismos precisos, podemos suponer que la disminución en el flujo de secreción de NaCl, formación de HA y disminución de la PIO producidos por los inhibidores de CA, se deben finalmente a una disminución de la captación de NaCl en la células del PE.

### **c) Proceso global de captación: antiportes frente a simporte.**

Como ya hemos visto, ambos sistemas son funcionales e intervienen en el proceso de captación; sin embargo, el aporte que tiene cada uno de los sistemas a la captación neta de NaCl desde el estroma, depende de la especie y de las condiciones experimentales.

Estudios de transporte de  $\text{Cl}^-$  a través de epitelio ciliar aislado en conejo (Crook, Takahashi et al. 2000) y bovino (Do and To 2000), y los estudios en ojo bovino perfundido arterialmente (Shahidullah, Wilson et al. 2003) muestran que ambos sistemas contribuyen de manera similar a la captación de NaCl en condiciones próximas a las fisiológicas.

Sin embargo los estudios realizados por McLaughlin et al (McLaughlin, Peart et al. 1998; McLaughlin, Peart et al. 2001) mediante microanálisis con sonda de electrones (EPMA), en epitelio ciliar de conejo, sugieren que los antiportes tienen un papel predominante. Los resultados que obtuvieron indican que al exponer los procesos a una solución que contiene  $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$  la concentración de  $\text{Cl}^-$  intracelular ( $\text{Cl}^-_i$ ) aumenta un 25%. Si en estas condiciones se inhiben las CAs mediante acetolamida, el  $\text{Cl}^-_i$  disminuye. Sin embargo en

ausencia total de  $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$  la acetolamida no tiene ningún efecto sobre la  $\text{Cl}_i^-$ . Como era de esperar, al bloquear el antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , mediante dimethylamilorida (DMA), obtuvieron también una disminución del  $\text{Cl}_i^-$ .

Al bloquear el simporte  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  mediante bumetanida, obtuvieron también una reducción del  $\text{Cl}_i^-$  en ausencia de  $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$ . Sin embargo en presencia de  $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$  la concentración de  $\text{Cl}_i^-$  aumenta con respecto a los valores normales.

Estos datos apuntan a un doble funcionamiento de este simporte. En presencia de  $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$  los antiportes aumentan su rendimiento en la captación de  $\text{Cl}^-$ , haciendo que aumente la  $\text{Cl}_i^-$ ; en estas condiciones el equilibrio termodinámico (fuerza motriz del simporte) se desplaza, por lo que el simporte funciona ahora expulsando  $\text{NaCl}$  al estroma. Si bloqueamos en estas condiciones el simporte, la  $\text{Cl}_i^-$  aumenta de forma extraordinaria.

La concentración de  $\text{Cl}^-$  a la cual se produciría la reversión del equilibrio termodinámico es de aproximadamente 50mM; muy próxima a la  $\text{Cl}_i^-$  basal calculada por Bowler et al en 1996 (Bowler, Peart et al. 1996) para epitelio ciliar de conejo.

El simporte reversible funcionaría como sistema de seguridad en caso de sobrecarga de  $\text{Cl}_i^-$ . El sistema revertiría el flujo, expulsando  $\text{Cl}^-$  al estroma, cuando el ratio de captura de  $\text{Cl}^-$  sobrepase el ratio de trasvase EP-ENP a través de las uniones en hendidura (tipo *gap*), o el flujo de salida en las células del NPE hacia el HA.

El efecto final que cada uno de estos sistemas tiene sobre la formación de HA y PIO se ha estudiado en modelo de ojo in vitro y en modelo animal in vivo. La bumetanida, al ser aplicada en ojo bovino perfundido, es capaz de disminuir la producción de HA; sin embargo, ni en macaco *cynomolgus* (Gabelt, Wiederholt et al. 1997) ni en ratón (Avila, Seidler et al. 2002), ambos modelos in vivo, fue capaz de variar la PIO. Los inhibidores del antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y de CA, al contrario que los del simporte, si tuvieron efecto disminuyendo la PIO en el ratón (Avila, Seidler et al. 2002). En este modelo, la bumetanida solo disminuye la PIO, al haber bloqueado anteriormente el antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Estos resultados

respaldan la hipótesis de la preponderancia de los antiportes como moduladores de la PIO, modificando los procesos de secreción de HA, y posiblemente también su drenaje (Avila, Mitchell et al. 2003).

#### **d) Otros canales que influyen en la dinámica EP-estroma**

En su membrana basolateral, las células del PE también expresan otros canales y transportadores, como la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{asa}}$  y canales de  $\text{Cl}^-$  (Jacob and Civan 1996), que influyen en el flujo neto de captación del NaCl desde el estroma. A través de estos canales, las células del PE, podrían secretar NaCl hacia el estroma, modificando en último término la producción de HA.

Los estudios de Fleischhauer de 2001 (Fleischhauer, Mitchell et al. 2001) muestran cambios volumétricos en células inmortalizadas de EP bovino, al sumergirlas en medio con ATP. Estos cambios volumétricos están relacionados con la apertura de canales de  $\text{Cl}^-$ . El ATP activaría los receptores  $\text{P2Y}_2$  (Shahidullah and Wilson 1997), lo que daría un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este aumento promovería la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) y la formación de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{AMP}_c$  lo que finalmente se traduciría en una apertura de los canales de  $\text{Cl}^-$  (Fleischhauer, Mitchell et al. 2001).

Sin embargo, al utilizar un análogo del  $\text{AMP}_c$  (8-bromo AMP cíclico) que actúa como inhibidor de la proteína quinasa A (PKA), se obtienen los mismos efectos que con el  $\text{AMP}_c$ ; lo que sugiere que el  $\text{AMP}_c$  debe actuar directamente sobre el canal de  $\text{Cl}^-$  en lugar de hacerlo a través de la PKA (Fleischhauer, Mitchell et al. 2001).

Estudios posteriores mediante patch-clamp y transporte de  $^{36}\text{Cl}$  (Do and To 2000), confirmaron que el  $\text{AMP}_c$  disminuía la secreción de  $\text{Cl}^-$  a través del epitelio ciliar bovino y activaba el maxi-canal de  $\text{Cl}^-$ . Este canal, que se activa mediante  $\text{AMP}_c$ , ha sido localizado en células del EP (Mitchell, Wang et al. 1997). Una característica de este canal dependiente de  $\text{AMP}_c$ , es la de aumentar su probabilidad de apertura ( $P_o$ ) con los incrementos de  $\text{Cl}^-_i$  (Do and Civan 2004) lo que sugiere que tiene un papel activo en la regulación y

mantenimiento de la concentración de  $Cl^-_i$ . En aquellas situaciones en las que el trasvase de  $Cl^-$  de EP a ENP o su salida hacia HA es menor que su captura desde el estroma, el maxi-canal de  $Cl^-$  actuaría incrementando el reciclado de este ion hacia el estroma al aumentar su propia  $P_o$  (Do and Civan 2004).

Aunque se desconoce cuál es el papel que ejerce el  $AMP_c$  como regulador de este sistema, sabemos que las células del EP liberan ATP al aumentar su volumen debido a la presión osmótica (Mitchell, Carre et al. 1998). De esta manera, al aumentar drásticamente la concentración de  $Cl^-_i$ , lo que aumenta la presión osmótica y el volumen de las células EP, estas liberarían ATP que podría poner en funcionamiento la vía de señalización de los  $P2Y_2$  antes mencionada, activando así el reciclado del  $Cl^-$  hacia el estroma. Esta vía de reciclado también puede formar parte de los procesos de reabsorción de HA que pueden darse en los procesos ciliares, y por lo tanto regular en parte la secreción neta final de HA.

### 2ª Etapa: trasvase EP-ENP

El trasvase de los solutos y el agua, captados en la superficie estromal, entre el EP y el ENP se realiza a través de las uniones en hendidura o tipo *gap*. Estas uniones intercelulares conectan tanto células vecinas de la misma capa (uniones EP-EP) como células adyacentes entre capas (uniones EP-ENP). La presencia de estas uniones, que conectan tanto células de la misma capa como células adyacentes de diferente capa sugieren que el epitelio ciliar se comporta funcionalmente como un sincitio. Esta visión está respaldada por múltiples estudios funcionales (Green, Bountra et al. 1985; Wiederholt and Zadunaisky 1986; Do and To 2000), estructurales y bioquímicos (Raviola and Raviola 1978; Coca-Prados, Ghosh et al. 1992; Coffey, Krushinsky et al. 2002). De hecho la utilización de octanol (Stelling and Jacob 1997) y heptanol (Mitchell and Civan 1997) como inhibidores de las uniones en hendidura, interrumpe la comunicación entre el EP y el ENP bovino. El heptanol, es además capaz de disminuir en aproximadamente un 80% la  $I_{sc}$  (asociada al

transporte de  $\text{Cl}^-$ ) en epitelio ciliar de conejo (Wolosin, Candia et al. 1997) y bovino (Do and To 2000).

El estudio de los movimientos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  mediante EPMA realizado por McLaughlin et al. en 2004 (McLaughlin, Zellhuber-McMillan et al. 2004) en epitelio ciliar de conejo, contradice esta visión del epitelio ciliar como un sincito funcional. Al bloquear la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATP}_{\text{asa}}$ , mediante la adición de ouabaina (en cara camerular, estromal o ambas) se obtiene un aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  y una disminución en la concentración de  $\text{K}^+$  intracelulares, que varía mucho entre células vecinas de la misma capa. De esta forma en algunas células varía de forma importante la concentración de iones, mientras que las células vecinas pueden permanecer en un estado basal o cercano al basal. Sin embargo la célula inmediatamente adyacente de la capa contigua presenta concentraciones de iones muy similares, haya variado o permanecido en condiciones basales. Tomando una célula cualquiera como referencia, si en ésta se ha producido una variación en las concentraciones de iones, en las células vecinas de la misma capa podemos encontrar o no variaciones en las concentraciones de iones, pero la célula inmediatamente adyacente de la capa contigua presentará variaciones muy similares en el contenido iónico.

Así pues, existen diferencias entre las uniones en hendidura según sean uniones EP-ENP, ENP-ENP o EP-EP. Estas diferencias pueden deberse en primer lugar, a la cantidad de uniones que se establecen entre los diferentes tipos celulares, ya que las uniones entre EP-ENP son mucho más numerosas que las que se establecen en uniones EP-EP y ENP-ENP (Raviola and Raviola 1978). En segundo lugar, las diferencias funcionales pueden deberse a diferencias estructurales. Se ha identificado la presencia de conexinas Cx40 y Cx43 en las uniones en hendidura entre células EP-ENP de epitelio ciliar de rata, a diferencia de las uniones entre ENP-ENP, las cuales presentan conexinas Cx26 y Cx31 (Coffey, Krushinsky et al. 2002).

Estas evidencias sugieren que la unidad mínima funcional del epitelio ciliar es el dúo EP-ENP, y que éste no es en realidad un sincito funcional.

### 3ª Etapa: Secreción de NaCl en el Humor acuoso

La etapa capital en la formación del HA es la secreción de NaCl hacia cámara posterior, generando un gradiente osmótico que moviliza el H<sub>2</sub>O. Las células del ENP son las responsables de este procesor secretor altamente regulado, liberando Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> al HA. Esta secreción se realiza principalmente mediante la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP<sub>asa</sub> y los canales de Cl<sup>-</sup>.

#### **a) Canales de Cl<sup>-</sup>**

El paso fundamental en la formación de HA es la secreción de Cl<sup>-</sup> hacia el HA. El Cl<sup>-</sup> es el principal ion secretado por el epitelio ciliar. En condiciones basales las células del ENP muestran una pequeña actividad de estos canales (Jacob and Civan 1996).

La liberación del Cl<sup>-</sup> es, probablemente, el paso limitante en la formación del HA en condiciones fisiológicas (Jacob and Civan 1996). Esta afirmación se basa en diferentes evidencias (Jacob and Civan 1996; Civan, Peterson-Yantorno et al. 1997):

- a) La concentración de Cl<sub>i</sub><sup>-</sup> es varias veces superior que la esperada para el equilibrio electroquímico, lo que indica que la captura de NaCl no limita el proceso de secreción.
- b) Las concentraciones de iones intracelulares y los potenciales de membrana, son muy similares en células PE y NPE, lo que sugiere que el trasvase de solutos y agua a través de las uniones tipo gap no es un paso limitante en el proceso.
- c) En condiciones basales la actividad de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP<sub>asa</sub> es muy elevada, por lo que no supone un punto limitante en la secreción del HA.

En este mismo sentido, los experimentos con NPPB (5-Nitro-2-[3-phenylpropyl amino]), inhibidor de los canales de Cl<sup>-</sup>, respaldan esta conclusión. Al inhibir los canales de Cl<sup>-</sup> en epitelio ciliar bovino, no sólo se

inhibe la secreción de  $\text{Cl}^-$  (Do and To 2000), sino también la formación de HA (Shahidullah, Wilson et al. 2003).

Se ha comprobado que ciertas situaciones o estímulos pueden generar cambios en la actividad basal de estos canales de  $\text{Cl}^-$ , aumentándola. Así, cambios en la presión osmótica en medios hipotónicos que producen un aumento de volumen celular (*swelling*) generan un aumento en la actividad de estos canales (Yantorno, Carre et al. 1992; Zhang and Jacob 1997). La inhibición de la proteína quinasa C (PKC) (Coca-Prados, Anguita et al. 1995; Shi, Barnes et al. 2002; Shi, Szczesniak et al. 2003), la activación de los receptores de adenosina A3 (Mitchell, Peterson-Yantorno et al. 1999; Carre, Mitchell et al. 2000) o la introducción de AMPc (Chen, Inoue et al. 1994; Edelman, Loo et al. 1995; Chen and Sears 1997) producen los mismos efectos.

Aun hoy en día se desconoce la identidad del canal o canales de  $\text{Cl}^-$  involucrados en la secreción de  $\text{Cl}^-$  hacia la cámara posterior. Algunas líneas de investigación sugieren al canal CLC-3 (activado por *swelling*) como el canal dominante en el transporte de  $\text{Cl}^-$  (Coca-Prados, Sanchez-Torres et al. 1996; Civan 2003). La sugerencia de este canal se fundamenta en primer lugar en la confirmación de su presencia en las células del ENP (Coca-Prados, Sanchez-Torres et al. 1996) y la respuesta característica de este canal a la PKC (Kawasaki, Uchida et al. 1994), que explicaría el comportamiento del ENP ante inhibidores de PKC (Civan, Coca-Prados et al. 1994; Coca-Prados, Anguita et al. 1995; Coca-Prados, Sanchez-Torres et al. 1996). Además, la supresión de la actividad de este canal mediante silenciamiento (Wang, Chen et al. 2000) o anticuerpo específico (Do and Civan 2004) reduce la corriente de  $\text{Cl}^-$ . Sin embargo, el papel del CLC-3 en células del ENP y otros tipos celulares es muy discutido (Hermoso, Satterwhite et al. 2002; Jentsch, Stein et al. 2002). En células acinares de páncreas y hepatocitos de ratón CLC-3 negativo (Knock-out), aunque retardada, mantienen la actividad de los canales de  $\text{Cl}^-$  asociada al *swelling* (Stobrawa, Breiderhoff et al. 2001), por lo tanto es posible que el papel del CLC-3 no sea el de principal canal de  $\text{Cl}^-$ , sino que simplemente sea uno de varios canales de un sistema más complejo (Yamamoto-Mizuma, Wang et al. 2004).

Otro canal estudiado por su posible papel principal en la secreción de  $\text{Cl}^-$  fue el  $\text{PI}_{\text{Cin}}$ . Fue clonado de células del ENP humanas (Anguita, Chalfant et al. 1995; Coca-Prados, Anguita et al. 1995) y se ha hallado también en células ENP bovinas (Chen, Wang et al. 1999). El uso de ARN silenciador en estas células ha reducido las corrientes de  $\text{Cl}^-$  asociadas al *swelling*, sin embargo, hallazgos posteriores demostraron que el  $\text{PI}_{\text{Cin}}$  se encontraba en el citoplasma, y que no sufría translocación a la membrana, ni aumentaba su expresión al tratar las células con medios hipotónicos (Sanchez-Torres, Huang et al. 1999). Estos hallazgos sugieren que su papel en la secreción de  $\text{Cl}^-$  es simplemente como regulador, y no como canal de membrana plasmática.

### **b) Simpotortador electroneutro $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$**

Se ha especulado con el aporte que este simportador pueda tener en la secreción de  $\text{Cl}^-$  hacia cámara posterior. Las diferencias encontradas en las medidas de secreción de  $\text{Cl}^-$  mediante radioisótopos y las calculadas mediante  $I_{\text{sc}}$ , abren la posibilidad de que este transportador cumpla una función activa en la secreción de  $\text{Cl}^-$  al humor acuoso (Pesin and Candia 1982). En este mismo sentido los hallazgos de la reversibilidad en este simporte, apoyan esta idea. De forma análoga a su comportamiento en células del EP, donde este simporte es capaz de revertir su sentido y secretar  $\text{NaCl}$  hacia el estroma, en condiciones termodinámicamente favorables, podría darse una secreción de  $\text{NaCl}$  desde las células ENP hacia cámara posterior a través de este simporte (McLaughlin, Peart et al. 1998).

A pesar de que se han hallado indicios de esta actividad simportadora en cultivos celulares de humano (Crook and Polansky 1994; Civan, Coca-Prados et al. 1996) y conejo (Dong and Delamere 1994); los estudios de Dunn et al de 2001 (Dunn, Lytle et al. 2001), en epitelio bovino, demostraron que la mayoría de la actividad simportadora se realiza en la cara estromal del ENP. Por lo tanto, aunque existe una actividad secretora hacia la cámara posterior mediada por este simporte en células del ENP, su contribución final puede considerarse mínima.

### **c) Otros transportadores y canales**

Se han descrito una gran cantidad de canales y transportadores en células ENP que participan en mayor o menor medida del proceso secretor en la formación del HA. Al igual que en las células del EP, como ya vimos anteriormente, uno de los más abundantes es la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}_{\text{asa}}$ . La presencia de este transportador en membrana basolateral de células NPE, y su importancia en la producción del HA, como la principal vía de secreción de  $\text{Na}^+$  hacia HA, ha sido profusamente descrita en la bibliografía desde hace muchos años (Bonting, Simon et al. 1961; Bonting and Becker 1964; Riley 1964; Cole 1977; Coca-Prados and Lopez-Briones 1987; Flugel and Lutjen-Drecoll 1988; Usukura, Fain et al. 1988).

Al igual que la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}_{\text{asa}}$ , el antiportador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  también se encuentra en los dos tipos de epitelio. En 1993, Wolosin y Chen et al. (Wolosin, Chen et al. 1993) detectaron la presencia de este antiportador en extracciones de la capa ENP de cuerpo ciliar de conejo. En este mismo modelo se ha detectado actividad de CA en membrana basolateral de ENP (Matsui, Murakami et al. 1996; Wu, Delamere et al. 1997), que como ya vimos anteriormente está muy relacionada con el reciclado de metabolitos utilizados por estos antiportadores.

Posteriormente, estudios volumétricos en cultivos de células de ENP humano, demostraron la actividad de estos antiportadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , así como la de simportadores  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  y canales de  $\text{Na}^+$  (Civan, Coca-Prados et al. 1996). De igual forma, se ha comprobado la existencia de  $\text{ARN}_m$  de la subunidad  $\alpha$  del canal ENaC en cuerpo ciliar humano (Civan, Peterson-Yantorno et al. 1997).

Todos estos sistemas de transporte podrían jugar un papel en la reabsorción del HA, tanto por su función transportadora, como por su localización en los procesos ciliares. La importancia fisiológica de los procesos de reabsorción del HA no está clara; pero se ha sugerido que gran parte del

$\text{Na}^+$  secretado por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{asa}}$  a cámara posterior, proviene de procesos de reabsorción del HA (McLaughlin, Zellhuber-McMillan et al. 2004).

Más allá de esta sugerencia, los estudios actuales demuestran una interrelación directa entre la CA, los antiportadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{asa}}$ . En un modelo propuesto por Shahidullah y colaboradores en 2013 (Shahidullah, Wei et al. 2013) se establece un nuevo punto de regulación de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{asa}}$  mediada por la activación de quinasas pertenecientes a la familia *Src* e interdependiente del pH. En última instancia, la regulación del pH intracelular que desencadena la secuencia de regulación, es modulada por las CA y los antiportadores.

Los estudios volumétricos antes mencionados (Civan, Coca-Prados et al. 1996), revelan también que los procesos de secreción y reabsorción, pueden estar regulados de forma opuesta por la misma vía. Al inhibir la PKC mediante estaurosporina, se produce tanto una inhibición de la reabsorción de fluidos en células hipotónicas; como una potenciación de la secreción de fluidos en células hipertónicas en medio hiposmótico (Civan, Coca-Prados et al. 1994; Civan, Coca-Prados et al. 1996). El mismo efecto es obtenido con la prostaglandina  $\text{PGE}_2$ , potenciando la secreción de  $\text{Cl}^-$ . El aumento en la secreción de fluidos parece estar mediado en gran parte por la activación de canales de  $\text{K}^+$ , que producen una hiperpolarización de membrana y un desplazamiento del equilibrio electroquímico, que favorece la salida de  $\text{Cl}^-$  (Civan, Coca-Prados et al. 1994); pero también puede sugerir el aumento de la formación de AMPc inducida por  $\text{PGE}_2$ , y la acción de este AMPc activando los canales de  $\text{Cl}^-$  (Do and Civan 2004)

Diferentes líneas de investigación (Flugel and Lutjen-Drecoll 1988; Eichhorn, Flugel et al. 1990; Dunn, Lytle et al. 2001; McLaughlin, Zellhuber-McMillan et al. 2001; McLaughlin, Zellhuber-McMillan et al. 2004) sugieren que los procesos de secreción y reabsorción en los procesos ciliares pueden tener una marcada polarización atendiendo a su localización; especialmente a lo largo del eje antero-posterior de los procesos ciliares (Fig. 1.7).

Estudios inmunocitoquímicos (Dunn, Lytle et al. 2001) y mediante sondas moleculares (Ghosh, Freitag et al. 1990; Ghosh, Hernando et al. 1991) han

demostrado diferencias regionales en la expresión de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATP}_{\text{asa}}$ . Los estudios de Coca-Prados y Sanchez-Torres de 1998 (Coca-Prados and Sanchez-Torres 1998), indicaban una mayor expresión de las isoformas  $\alpha_1/\alpha_2/\alpha_3/\beta_1/\beta_2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATP}_{\text{asa}}$  en la región anterior que en la posterior del ENP de bobino. El EP sin embargo, mostraba una expresión constante de las isoformas  $\alpha_1/\beta_1$  sin variaciones dependientes de la región; lo cual concuerda con una diferenciación regional en las funciones de secreción. Estos estudios concuerdan con datos anteriores, obtenidos por Ghosh et al en 1991 (Ghosh, Hernando et al. 1991) sobre expresión génica de las diferentes isoformas de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATP}_{\text{asa}}$ ; y fueron confirmados posteriormente mediante inmunolocalización por Wetzel et al en 2001 (Wetzel and Sweadner 2001).

En el mismo sentido, experimentos funcionales sobre el transporte iónico mediante EPMA, en los que se alteran las condiciones basales de  $\text{Cl}^-_i$ , muestran cambios mayores en la zona anterior que en la zona posterior de epitelio ciliar de conejo (McLaughlin, Macknight et al. 2001). Estos experimentos, y los realizados mediante la misma técnica, en presencia de ouabaina (bloqueador de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATP}_{\text{asa}}$ ) (McLaughlin, Zellhuber-McMillan et al. 2004); demostraron que el intercambio de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , y  $\text{Cl}^-$  es mucho más activo en la zona anterior del epitelio ciliar que en la posterior; por lo que probablemente en la zona anterior sean predominantes los movimientos de secreción y en la zona posterior se den los fenómenos de reabsorción (Do and Civan 2004).

### **Regulación de los canales de $\text{Cl}^-$ : importancia del AMPc**

Actualmente no existe un modelo de señalización intracelular que integre y aglutine todos los procesos que actúan en la regulación de la secreción para la formación del HA.

En la literatura se describen multitud de señalizadores y rutas de señalización intracelular que actúan en el control de este proceso. Han sido descritos como moduladores de este proceso las catecolaminas, el péptido antinatriurético, endotelinas, cannabinoides, activadores de receptores

muscarínicos, el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), corticoides y purinas (Do and Civan 2004).

También existe una amplia bibliografía de la influencia de cascadas de señalización en las que intervienen prostaglandinas, AMPc, GMPc (Chu and Candia 1985; Chu, Candia et al. 1986; Carre and Civan 1995) la vía de la PKC y la PKA (Civan, Coca-Prados et al. 1994) y la influencia del pH, el Ca<sup>+</sup>, el óxido nítrico (NO) , y la ruta de las MAP quinasas (Horio, Sears et al. 1996; Crook and Chang 1997; Brubaker 1998; Shahidullah and Wilson 1999; Ellis, Nathanson et al. 2001; Liu, Flammer et al. 2002; Shi, Barnes et al. 2002; Shi, Szczesniak et al. 2003; Wu, Flammer et al. 2003; Zhang, Krishnamoorthy et al. 2003; Dortch-Carnes and Tosini 2013). Sin embargo la importancia relativa de cada una y la interrelación entre ellas aún es desconocida.

El papel del AMPc como regulador de la secreción neta iónica en el HA ha sido estudiado, de forma intensiva, durante los últimos 30 años. Sin embargo los resultados encontrados son en muchos casos contradictorios.

Así, el isoproterenol, un agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, induce un aumento del AMPc; que promueve la activación del simporte Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> en las células del PE y aumenta la secreción de Cl<sup>-</sup> a través del epitelio de conejo (Crook, Takahashi et al. 2000). Como ya hemos visto anteriormente, es posible que el AMPc active ciertos canales de Cl<sup>-</sup> de las células del ENP (Chen, Inoue et al. 1994; Edelman, Loo et al. 1995; Chen and Sears 1997), por lo que esperaríamos que el AMPc actuaría en los dos epitelios favoreciendo la salida de Cl<sup>-</sup> y la formación del HA. Sin embargo, el AMPc no incrementa la formación de HA, y la utilización de forskolina para aumentar los niveles de AMPc, produce el efecto contrario, disminuyendo la presión intraocular (PIO) en conejo, mono y humano. Sabemos que en conejo, esta reducción de la PIO, está relacionada directamente con una disminución en la secreción del HA, ya que no se observa ni aumento en el drenaje, ni disminución en el flujo de sangre en la cara estromal (Caprioli and Sears 1983; Caprioli and Sears 1984; Lee, Podos et al. 1984).

Los antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos como el timolol, han demostrado ser agentes muy eficientes en el tratamiento del glaucoma debido

a la disminución de la PIO que producen. Sin embargo, al bloquear los terminales  $\beta$ -adrenérgicos, sabemos que se produce una disminución del AMPc intracelular; por lo que podríamos esperar el efecto contrario al descrito por Caprioli en 1983 (Caprioli and Sears 1983).

Esta aparente contradicción quedó resuelta por los estudios de McLaughlin de 2001 (McLaughlin, Peart et al. 2001), en los que se demuestra que aunque se dé una disminución de la concentración de AMPc, la acción del timolol sobre la secreción en epitelio ciliar, es independiente de ésta. De esta forma la acción de los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos sobre la secreción de HA queda desacoplada del AMPc.

La acción del AMPc en la regulación de la secreción neta de  $\text{Cl}^-$  es compleja, y puede ejercer más de un papel como modulador en los diferentes pasos de la formación del HA. Así, como ya hemos visto, puede estar relacionado con la reversibilidad del simporte  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  o la activación de canales de  $\text{Cl}^-$  de las células del EP, aumentando la secreción hacia estroma y disminuyendo la formación del humor acuoso (Do and Civan 2004). Además, el AMPc puede estar modulando las uniones en hendidura (tipo *gap*), desacoplando el EP y el ENP (Do, Kong et al. 2004) o modificando la secreción de iones de las células ENP (Delamere and King 1992; Nakai, Dean et al. 1999).

Sea como fuere, la diversidad encontrada en los datos, no permite dilucidar cuál es el papel preciso que el AMPc juega en la secreción neta de  $\text{Cl}^-$  y la producción de HA; más allá de que es un papel complejo. Quizás la respuesta final al AMPc este más relacionada con pequeños cambios locales en su concentración, que debido a cambios en la concentración total intracelular. En 2001, Huang (Huang, Lazarowski et al. 2001) demostró que pequeños cambios locales en la concentración de AMPc eran capaces de activar los canales CFTR, sin cambiar significativamente la concentración total en células Calu-3. Esta compartimentalización en el comportamiento del AMPc podría explicar la variedad de los resultados encontrados hasta ahora.

## **Regulación de la secreción del HA: importancia de las CA**

El papel regulador de las CA en la formación del HA fue descrito inicialmente por Friedenwald en 1955 (Friedenwald 1955). La inhibición de la CA ha demostrado ser eficaz reduciendo la producción de HA en una gran variedad de modelos animales (Stein, Pinke et al. 1983; Bar-Ilan, Pessah et al. 1984; Kishida, Miwa et al. 1986; Wang, Serle et al. 1991) y en humano (Dailey, Brubaker et al. 1982; Rosenberg, Krupin et al. 1998).

Si bien ya hemos mencionado con anterioridad dos posibles puntos de regulación de la producción de HA en el que podría estar implicada la CA (apartado 2.1.1. 1ª Etapa: Captación de NaCl del estroma; 3ª Etapa: Secreción de NaCl), el papel de ésta y los mecanismos de regulación que ejerce, distan aún de haber sido esclarecidos.

Actualmente se han descrito quince isoenzimas diferentes, (Hilvo, Tolvanen et al. 2005) nombradas como CA I a CA XV, que se diferencian principalmente en función de sus propiedades cinéticas, localización celular y distribución tisular (Sly and Hu 1995; Lindskog 1997).

Dentro de los procesos ciliares, más allá de la ya mencionada localización en EP, se ha constatado la presencia de diferentes isoenzimas de CA en ENP. Así, por ejemplo, en proceso ciliar de humano, se ha demostrado la existencia de CA II, no sólo en EP sino también en ENP (Wistrand, Schenholm et al. 1986). De igual forma CA IV ha sido localizada tanto en membrana basolateral de PE como de NPE de conejo (Murakami, Sears et al. 1992).

En este trabajo, y con el objeto de diferenciar la acción de las CA en los dos epitelios se utilizó benzolamida, inhibidor de la CA no permeable a membrana plasmática. Los resultados demostraron, que la utilización de este inhibidor modificaba el transporte iónico de forma más importante al aplicarlo en la cara basolateral de NPE que en PE, sugiriendo un papel regulador preponderante de la CA de NPE.

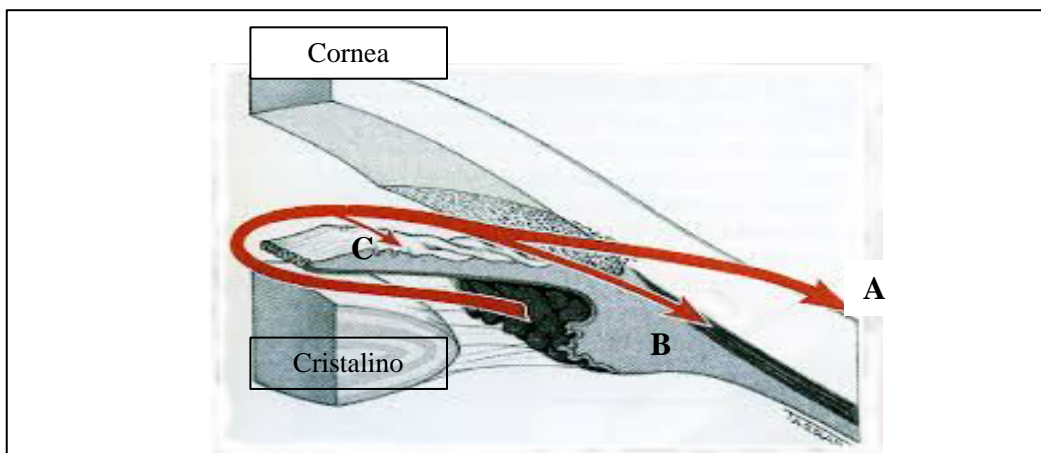
A pesar de la relevancia de los datos aportados por este estudio, se ha constatado la ausencia de la isoforma CA IV en proceso ciliar humano (Hageman, Zhu et al. 1991; Liao, Ivanov et al. 2003), lo que descarta a esta

isoforma como la principal responsable de los efectos de los inhibidores de AC en la producción de HA. En contraposición a esta isoforma, la CA XII aparece sobreexpresada en pacientes de glaucoma con hipertensión ocular (Liao, Ivanov et al. 2003), lo que puede sugerir su implicación en la regulación de los procesos de secreción de HA.

A pesar de quedar demostrado que las CA pueden actuar como reguladores de la formación del HA no solo a nivel de PE, sino también en el ENP, los mecanismos de su actuación no han sido aún elucidados. En este sentido, la confirmación de la presencia de antiportadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  en la cara basolateral de NPE de conejo (Wolosin, Bonanno et al. 1991; Wolosin, Chen et al. 1993), podría sugerir que el papel de las CA en ENP sea similar al ya propuesto en EP.

## 2.2 DRENAJE DEL HUMOR ACUOSO

Como ya hemos visto, el HA, después de ser secretado por los procesos ciliares hacia la cámara posterior, atraviesa el iris y pasa a la cámara anterior; desde donde será drenado a nivel del ángulo iridocorneal por las vías de evacuación (Fig. I.8) (Bill 1966). Existen dos vías principales de evacuación del HA hacia la circulación venosa: la vía trabecular (convencional) y la vía uveoescleral (no convencional).



**Figura I.8. Vías de drenaje del humor acuoso.**

Representación esquemática de las diferentes vías drenaje del humor acuoso:

**A.** Vía convencional **B.** Vía uveoescleral **C.** Vía iris.

Imagen modificada de <http://blogs.sld.cu/elierortiz/2013/03/25/vias-de-drenaje/>

### 2.2.1 Vía Trabecular, Convencional o Presión Dependiente

Es la vía principal por la que se drena el HA. Mediante esta vía se evacúa aproximadamente el 80-90% de HA en humanos, variando el porcentaje en otras especies.

Para su evacuación, el HA atraviesa diferentes capas que constituyen la red trabecular: uveoescleral, corneoescleral y cribiforme, hasta alcanzar el canal de Schlemm. Desde aquí el HA alcanza los canales colectores, por los cuales es drenado hacia las venas intraesclerales y episclerales (Kaufman and Gabelt 2004).

En su paso hacia el canal de Schlemm, el HA atraviesa la pared interna del endotelio de este canal, por dos rutas diferentes: paracelular o transcelular. En la vía paracelular, el HA, fluye por los estrechos pasos intercelulares que separan las células del endotelio. En la vía transcelular o transendotelial, el HA, atraviesa la célula endotelial por poros o estructuras invaginadas, que facilitan el tránsito mediante vacuolas gigantes.

De las dos vías, la transcelular es la principal forma de trasvase de HA al interior del canal. La particularidad de las estructuras de la vía transcelular es su regulación mediante mecanismos de presión. Así, un aumento de la PIO tiene como resultado el aumento en número de estas estructuras; dándose casi su desaparición total cuando ésta disminuye (Bill and Barany 1966). De esta manera, en un rango de presiones normales, el aumento en la PIO irá acompañado de un aumento lineal en la evacuación del HA; sin embargo superado cierto límite de presión, el drenaje disminuye debido a la compresión de la red trabecular y del canal, lo que aumenta la resistencia al paso de fluidos (Brubaker 1991).

### 2.2.2 Vía Uveoescleral, no Convencional o presión independiente

Es una vía minoritaria de salida del HA. Supone aproximadamente un 10-20% del HA drenado en humanos. La falta de una barrera epitelial entre la cámara anterior y el músculo ciliar, favorece la entrada del HA en el cuerpo ciliar desde el ángulo iridocorneal. El líquido fluye libremente entre los haces musculares y penetra en los espacios supracoroideo y supraciliar, desde donde puede alcanzar la esclera. La vía uveoescleral es relativamente insensible a los aumentos de presión (Kaufman and Gabelt 2004).

## 3. LA PRESION INTRAOCULAR (PIO)

Todos los tejidos intraoculares soportan una fuerza hidrostática denominada presión intraocular (PIO). La PIO viene determinada por el volumen de HA existente en las cámaras anterior y posterior, y ayuda al mantenimiento de la forma esférica del globo ocular.

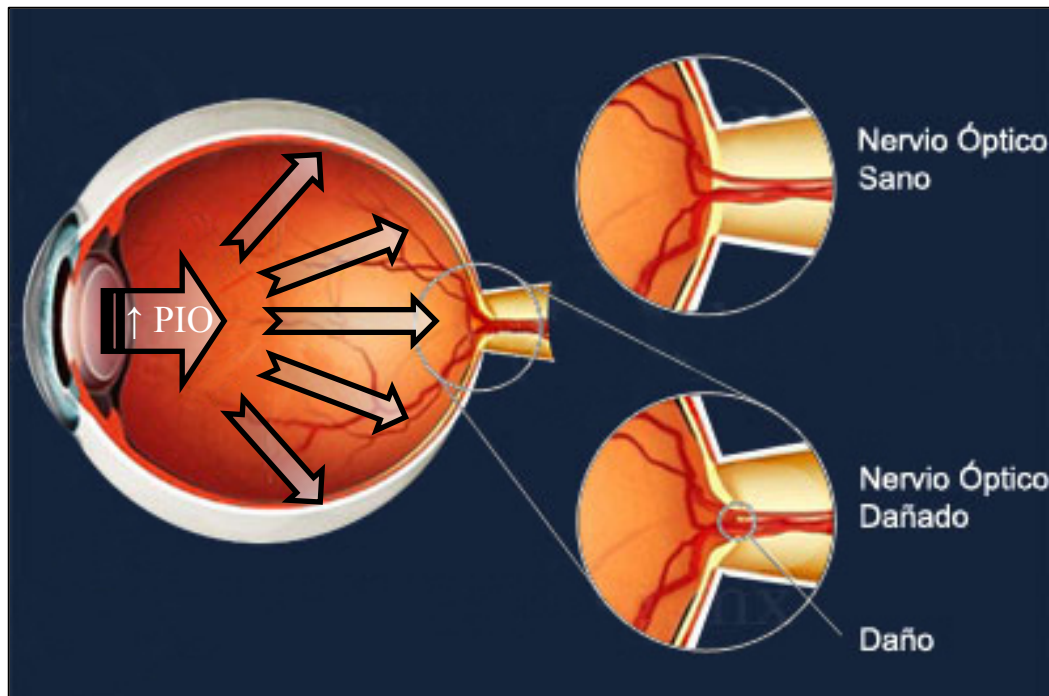
Existe un sistema complejo de equilibrio dinámico que mantiene la PIO dentro de unos niveles estables. En este equilibrio interviene la formación constante del HA y su drenaje por las vías de evacuación. Variaciones en cualquiera de estos dos factores tiene como resultado la variación de la PIO.

En condiciones de equilibrio la PIO permanece constante, y el volumen de HA producido equivale al drenado. Podemos expresar este equilibrio de la siguiente manera:

$$F_{in} = F_{out} = F_{trab} + F_u$$

Donde  $F_{in}$  es el flujo de entrada del HA a cámara posterior,  $F_{out}$  es el flujo total de salida del HA, ya sea mediante el flujo de salida a través de maya trabecular  $F_{trab}$ , o a través de la vía uveoescleral  $F_u$ .

En humanos, aunque puede fluctuar ligeramente, este equilibrio se establece alrededor de los 16 mm de Hg; lo que es considerado un valor de PIO normal (Hart 1992). Cuando este valor supera los 21 mm de Hg se considera que estamos en situación de hipertensión ocular (Schottenstein 1996).



**Figura I.9. Presión intraocular.**

Representación esquemática de las fuerzas ejercidas por la elevación de la presión intraocular sobre las paredes de la retina y el nervio óptico. Detalle de neuropatía asociada a glaucoma por daño sobre el nervio óptico.

*Imagen modificada de <http://www.lookfordiagnosis.com>*

La hipertensión ocular es una situación fisiológica anómala relacionada con la aparición de patologías oculares como el glaucoma. La relación existente entre la hipertensión ocular y la patología glaucomatosa es bien conocida desde hace muchos años (Rozovskaia 1964). Incluso hoy en día se sigue considerando la hipertensión ocular como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de esta enfermedad (Abdull, Gilbert et al. 2015; Li and Wu 2015; Rossetti, Digiuni et al. 2015; Tamm, Braunger et al. 2015).

El glaucoma es una patología caracterizada por la pérdida del campo visual asociada al daño en el nervio óptico y la retina, que desemboca en una pérdida total de la visión. En el glaucoma de ángulo abierto, el más prevalente (Therkelsen and Quirk 2001), la hipertensión ocular es la causa directa de la

aparición de la patología, por lo que la estrategia terapéutica más común consiste en la reducción de la PIO (Fig. 1.9).

Gran parte del arsenal farmacológico disponible para el tratamiento de la hipertensión ocular y la reducción de la PIO tiene como dianas diferentes mecanismos integrados en la maquinaria de regulación de la dinámica del HA.

### 3.1 REGULACION DE LA DINÁMICA DEL HUMOR ACUOSO

Los niveles de PIO no permanecen constantes a lo largo del día, sino que se producen variaciones entre el ciclo diurno y el nocturno. Las variaciones circadianas de la PIO están ampliamente documentadas en diferentes especies como el perro (Piccione, Giannetto et al. 2010), el conejo (Rowland, Potter et al. 1981; Zhao, Hejkal et al. 2010), el mono (Komaromy, Brooks et al. 1998; Liu, Zeng et al. 2011), y en humano (Liu, Fan et al. 2011); y se dan tanto en sujetos sanos como en sujetos con hipertensión ocular.

Estas variaciones de la PIO a lo largo del ciclo circadiano, reflejan cambios en la dinámica del HA. En humanos, la tasa de formación de HA fluctúa entre los 2.61  $\mu\text{l}/\text{min}$  durante las horas diurnas y los 1.08  $\mu\text{l}/\text{min}$  durante las nocturnas (McCannel, Heinrich et al. 1992).

Las variaciones circadianas de la PIO implican la existencia de un sistema que regule la dinámica del HA. Aunque los mecanismos de esta regulación no se conocen por completo, sabemos que el sistema nervioso está implicado en el control de la dinámica del HA. Esta regulación se efectúa principalmente por medio del sistema simpático y parasimpático, aunque también el sistema nervioso central podría actuar, a través de las vías aferentes o sensitivas, en el control neural de la PIO. De hecho, se han encontrado vías aferentes sensibles a la PIO, que se comunican con el cerebro. Otros autores han señalado la importancia de las vías eferentes o motoras y su implicación en el control de la dinámica del HA (Bergmanson 1982).

### 3.1.1 Sistema adrenérgico o simpático.

En el ojo encontramos una rica inervación tanto del sistema simpático como del parasimpático. La inervación simpática parte del ganglio cervical e inerva el iris y los vasos uveales principalmente, aunque también existen fibras que llegan a los procesos ciliares (Stone and Kuwayama 1989).

La relación del sistema simpático con la PIO es bien conocida. La gran mayoría de los datos que relacionan la acción del sistema simpático con la PIO se han obtenido mediante la utilización de agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos. Así, la utilización de agonistas beta aumenta la producción de HA en monos durante el sueño (Bill 1970; Gharagozloo, Larson et al. 1988; Stone and Kuwayama 1989), sin embargo la utilización de estos agonistas fuera de la fase de sueño no genera ningún cambio en la producción de HA. Los antagonistas beta promueven el efecto contrario, produciendo una disminución en la formación del HA (Topper and Brubaker 1985). Este mismo efecto es producido por los agonistas de los receptores alfa (Lee, Topper et al. 1984). La conclusión lógica es que el sistema simpático regula la PIO principalmente mediante los adrenoreceptores  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  presentes en los procesos ciliares (McLaren 2009).

Existen numerosos fármacos para el tratamiento del glaucoma basados en antagonistas de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  (ej. timolol, levobunolol, metipranolol...) y agonistas de los receptores adrenérgico  $\alpha_2$  (ej. brimonidina, apraclonidina, dipivefrina...). Estos fármacos reducen la PIO mediante una disminución de la producción del HA. Los agonistas de receptores  $\alpha_2$  también producen un aumento en el drenaje uveoescleral.

#### 3.1.1.1 Receptores $\beta$

Los antagonistas de receptores  $\beta$  son ampliamente utilizados en el tratamiento del glaucoma por su acción hipotensora sobre la PIO. La presencia de estos receptores en proceso ciliar explican que  $\beta$ -bloqueantes como el

timolol disminuyan la secreción de HA (Coakes and Brubaker 1978). Este efecto inhibitor solo tiene lugar durante el día ya que, debido a los ciclos circadianos seguidos por el sistema nervioso simpático, no se produce estimulación de estos receptores en el ciclo nocturno (Hirota, Kiuchi et al. 1997; Feldman, Stewart et al. 2008).

El adrenoreceptor beta fue localizado *in vivo* por primera vez en proceso ciliar de rata mediante un análogo fluorescente del propanolol en 1978 (Lahav, Melamed et al. 1978). Poco después también fue identificado en homogeneizado purificado de proceso ciliar en conejo (Bromberg, Gregory et al. 1980), y en humano (Nathanson 1980; Nathanson 1981). Sin embargo la implicación de estos receptores en la regulación de la PIO ya era conocida una década antes. En 1967, Philips et al, publicaron que la administración sistémica de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico (propanolol) (Phillips, Howitt et al. 1967), o su administración tópica (Vale, Gibbs et al. 1972) producían una disminución de la PIO en humanos. En 1976 Katz et al demostraron la eficacia tópica de otro antagonista  $\beta$ , el timolol, en la disminución de la PIO (Katz, Hubbard et al. 1976); al cual siguieron otros antagonistas como el betaxolol (antagonista selectivo  $\beta_2$ ) (Reiss and Brubaker 1983; Gaul, Will et al. 1989; Coulangeon, Sole et al. 1990) y el levobunolol (Gaul, Will et al. 1989).

La aplicación de la fluorometría en el estudio clínico de estos nuevos fármacos ayudó a elucidar su mecanismo de acción hipotensor, demostrando que éste se basa en una disminución en la producción del HA que oscilaba entre el 30% y el 47% (Coakes and Brubaker 1978; Yablonski, Zimmerman et al. 1978; Schenker, Yablonski et al. 1981).

Los receptores  $\beta$ , pertenecen al grupo de proteínas con siete dominios hidrofóbicos (de 20 a 28 residuos) transmembrana acoplados a proteína G. En la actualidad han sido descritos tres subtipos de este receptor, en función de su localización (pre-sináptica o post-sináptica) y respuesta a agonistas-antagonistas específicos:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Experimentos farmacológicos con agonistas beta mediante mediciones de la estimulación de la adenilato ciclasa, indican que el receptor presente en procesos ciliares de humanos y conejo es el subtipo  $\beta_2$  (Nathanson 1980; Nathanson 1981). Estudios posteriores en

membranas de iris-cuerpo ciliar de conejo mediante radioligandos cuantificaron que entre el 20-25% de los receptores adrenérgicos pertenecen al subtipo  $\beta_2$  (Mittag and Tormay 1985). En humano se ha determinado que el 90% de los receptores  $\beta$  de iris-cuerpo ciliar son también de este subtipo (Wax and Molinoff 1987).

De forma clásica, se ha descrito al AMPc como el principal mediador intracelular de los receptores  $\beta$ . Los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  se encuentran acoplados a la proteína  $G_s$ , cuya activación promueve el aumento intracelular de éste mediador. Muchos artículos señalan al aumento de AMPc, promovido por agonistas beta-adrenérgicos, o la disminución de éste, causada por beta-bloqueantes, como el factor responsable del aumento o la disminución en la producción del humor acuoso y la PIO (Potter, Crosson et al. 1990; Osborne and Chidlow 1996; Hirota, Kiuchi et al. 1997). Sin embargo, esta hipótesis quedó cuestionada por los hallazgos publicados por McLaughlin et al en 2001 que desacoplan la acción hipotensora del timolol (antagonista beta-adrenérgico) del AMPc (McLaughlin, Peart et al. 2001).

De forma paralela al acoplamiento de los receptores  $\beta$  al AMPc; para el subtipo  $\beta_3$  ha sido descrita la asociación con proteína  $G_{i/o}$  (Morris and Malbon 1999), cuyos efectos serían contrarios a los anteriormente descritos; y pueden activar la fosfolipasa C (PLC) y la vía del  $[Ca^{2+}]_i$ .

### 3.1.1.2 Receptores $\alpha$

En 1966, Makabe (Makabe 1966) refiere por primera vez la acción hipotensora de un agonista  $\alpha_2$ , la clonidina, tras su administración sistémica. A pesar de no conocer específicamente su mecanismo de acción, sabemos que este agonista modifica la PIO reduciendo la producción de HA (Lee, Topper et al. 1984). Derivados como la apraclonidina, presentan, mediante aplicación tópica, disminuciones de un 30-40% en la generación del HA (Gharagozloo, Larson et al. 1988). Este ratio de reducción es muy similar a los producidos por antagonistas  $\beta$  como el timolol (Gharagozloo, Relf et al. 1988; Schadlu, Maus et al. 1998; Maus, Nau et al. 1999), aunque en el caso de la apraclonidina, el

efecto sobre la producción de HA si se mantiene durante los periodos de sueño (Koskela and Brubaker 1991).

Al igual que en el caso de los  $\beta$ -adrenérgicos, los receptores  $\alpha$  se dividen en dos subtipos,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , atendiendo a las diferencias de afinidad por adrenalina (A) y noradrenalina (NA). Los adrenoreceptores  $\alpha_1$  son activadores de la proteína  $G_{q/11}$ ; asociada, en la mayoría de tejidos, a la activación de la fosfolipasa C (PLC); desencadenando un aumento de las concentraciones de inositol trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG), e ion cálcico intracelular  $[Ca^{2+}]_i$ . Los adrenoreceptores  $\alpha_2$  se acoplan sin embargo a proteína  $G_{i/o}$ ; por lo que su respuesta final se traduce en una disminución de los niveles intracelulares de AMPc, aunque pueden desencadenar también la activación de PLC.

Mediante el uso de adenina marcada (3H-adenina) se ha demostrado la existencia de receptores  $\alpha$  activos y funcionales en proceso ciliar de conejo (Mittag and Tormay 1985). Al igual que en el caso de los receptores  $\beta$ , existe una desigualdad en la expresión de los diferentes subtipos, mostrando una clara preponderancia del subtipo  $\alpha_2$  frente a los  $\alpha_1$  (Mittag and Tormay 1985). Esta preponderancia hace que el subtipo  $\alpha_2$  sea especialmente activo y por lo tanto juegue un importante papel en la formación del humor acuoso (Berman 1991).

Se han clonado tres subtipos de receptores  $\alpha_2$  en humano:  $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$  y  $\alpha_{2c}$  (Bylund, Blaxall et al. 1992; Philipp, Brede et al. 2002). Los tres subtipos presentan una gran similitud en su secuencia de aminoácidos, diferenciándose principalmente en las modificaciones post-trascricpcionales, su localización tisular y la respuesta a diferentes agonistas y antagonistas (Link, Daunt et al. 1992; MacKinnon, Spedding et al. 1994; Bylund 1995; MacDonald, Kobilka et al. 1997; Cleary, Vandeputte et al. 2002). Estudios con ratones “knock-out” sitúan los receptores  $\alpha_{2a}$  principalmente en los terminales presinápticos del sistema nervioso central, los receptores  $\alpha_{2b}$  en los terminales postsinápticos del sistema nervioso central, y los  $\alpha_{2c}$  en los terminales pre y post sinápticos del sistema nervioso periférico (MacDonald, Kobilka et al. 1997; Philipp, Brede et al. 2002). En el órgano ocular su distribución es también diferencial variando mucho entre especies. El receptor  $\alpha_{2a}$  se ha localizado en coroides y retina de

ojo humano y porcino, aunque en este último modelo también se haya presente el receptor  $\alpha_{2c}$  en retina (Bylund and Chacko 1999; Hein 2001).

La distribución en polo anterior también difiere atendiendo a la especie. Mientras que en procesos ciliares de conejo se han encontrado los tres subtipos de receptores  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$ ,  $\alpha_{2c}$ ), en procesos humanos solo se han detectado los subtipos  $\alpha_{2b}$  y  $\alpha_{2c}$  (Huang, Gil et al. 1995).

En la actualidad existe un importante arsenal farmacológico antihipertensivo cuya diana de acción son estos receptores. La utilización de esta gran cantidad de agonistas y antagonistas en diferentes modelos animales, sirven para dilucidar el papel que estos receptores desempeñan en la dinámica del humor acuoso.

Los estudios realizados en ojo de gato por Chiou en 1983 (Chiou 1983) demuestran una acción simultánea de estos compuestos sobre la producción y el drenaje del HA, que en muchos casos es antagónica. Así, el agonista  $\alpha_1$  fenilefrina presenta efectos hipertensivos a pesar de disminuir un 27% la producción de HA; ya que paralelamente, promueve una disminución del 67% en su evacuación. De forma opuesta, los antagonistas  $\alpha_1$  muestran claros efectos hipotensores sobre la PIO; sin embargo, como ya hemos apuntado anteriormente, las diferencias de expresión de dichos receptores en diferentes especies condicionan el mecanismo hipotensor. En conejo y mono la corinantina (antagonista  $\alpha_1$ ) no tiene efectos ni sobre la producción ni sobre la evacuación del HA medidas por Serle et al. (Serle, Stein et al. 1984); por lo que suponen que el efecto hipotensor es debido a un aumento del drenaje uveoescleral. Sin embargo, el prazosín (también antagonistas  $\alpha_1$ ) en ojo de gato reduce la evacuación del HA un 25%, mientras que su producción disminuye un 55%, hecho que explica el efecto hipotensor final sobre la PIO (Chiou 1983).

Este mismo estudio (Chiou 1983) aclara el papel de los receptores  $\alpha_2$ . A diferencia de los receptores  $\alpha_1$ , tanto los agonistas (clonidina) como los antagonistas (corinantina)  $\alpha_2$  presentarían un efecto final hipotensor. Mientras

que el antagonista produce una disminución del drenaje (40%) muy inferior a la disminución en la formación del HA (60%), el agonista promueve una importante disminución de la producción de HA (60%) sin alterar su drenaje.

### 3.1.2 Sistema colinérgico o parasimpático.

La utilización de compuestos activos que modifican directamente la transmisión parasimpática en el ojo, data de hace 2000 años aproximadamente. Los antiguos egipcios utilizaban el extracto de la *Atropa belladonna* como cosmético para, mediante la dilatación de la pupila, resaltar los ojos.

Su uso clínico, sin embargo, es mucho más reciente. No fue hasta la época moderna cuando la atropina (por su acción inhibitoria sobre los receptores de acetil colina) comenzó a utilizarse en las exploraciones oftalmológicas como dilatador pupilar. La utilización de esta nueva herramienta farmacológica pronto reveló nuevos efectos no deseados como el aumento de la presión intraocular. Este descubrimiento pronto originó una nueva vía terapéutica basada en la utilización de inhibidores de colinesterasas (Shaffer and Hetherington 1966). Estos fármacos aumentan el efecto y duración de las acetilcolinas al disminuir su degradación, y fueron ampliamente utilizadas como tratamientos antihipertensivos en la década de los 60. La utilización de este nuevo arsenal terapéutico trajo sin embargo, efectos poco deseables, entre los que se destaca el considerable aumento de la probabilidad de desarrollar cataratas (Shaffer and Hetherington 1966).

Los receptores muscarínicos son los principales responsables de la respuesta colinérgica. En la actualidad se han definido cinco subtipos de este receptor (Caulfield 1993), con una amplia distribución diferencial en las estructuras oculares. Esta expresión diferencial de subtipos es responsable de numerosas funciones en el ojo en las que se incluyen la regulación del crecimiento axial (Gimbel 1973; Lind, Chew et al. 1998), la regulación de la

secreción lacrimal (Dartt 2001) y diferentes vías de señalización celular en cristalino (Collison, Coleman et al. 2000).

Como ya hemos visto, la influencia de los colinérgicos en la dinámica del HA es de sobra conocida. Clásicamente su efecto hipotensor ha sido asociado al aumento en el drenaje del HA a través de su acción sobre el musculo ciliar. La contracción de este musculo propiciada por estos fármacos colinérgicos, aumenta los espacios intertrabeculares, incrementando la evacuación de fluido a través de dichos espacios (Kaufman and Barany 1976; Zimmerman 1981).

Más allá de la visión clásica, actualmente sabemos que el control de la dinámica del HA por esta vía de regulación es doble. Ya a finales de la década de los 70 se tenían evidencias de inervación colinérgica en procesos ciliares (Mindel and Mittag 1976; Gwin, Gelatt et al. 1979) y en 2001 Ellis et al (Ellis, Nathanson et al. 2001), demostraron la capacidad del carbachol (agonista no metabolizable de los receptores muscarínicos) de inactivar la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{asa}}$  en un proceso que implicaba la mediación del NO y el GMPc. Un trabajo reciente de Shahidullah et al. publicado en 2014 (Shahidullah, Mandal et al. 2014), confirma la influencia de esta vía sobre la dinámica de secreción del humor acuoso (AH), y la intervención de la fosfo quinasa G (PKG) dependiente de activación de la familia de quinasas Src (SFK) en la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{asa}}$ .

Esta doble regulación de la dinámica del humor acuoso (AH) induciendo su drenaje (Wiederholt, Schafer et al. 1996) e inhibiendo su producción (Ellis, Nathanson et al. 2001) resulta extremadamente interesante para el desarrollo de nuevos fármacos contra la hipertensión ocular; sin embargo los efectos secundarios anteriormente descritos hacen necesario la búsqueda de análogos más específicos para los subtipos de receptor muscarínico que minimicen los efectos no deseados

### 3.1.3 Otros factores que influyen en la regulación del HA.

La dinámica del HA es un sistema homeostático diseñado para mantener unas condiciones estables que posibiliten el funcionamiento global del órgano visual. Sin embargo son muchos los factores que influyen en el equilibrio dinámico del HA. Variaciones del estado fisiológico del individuo pueden alterar las condiciones de este equilibrio.

Las situaciones de hipotermia comportan una disminución en la producción de HA. Se ha comprobado en conejo, que la disminución de la temperatura corporal produce una disminución progresiva de la formación de HA, probablemente asociada a una disminución de la actividad metabólica de los procesos ciliares (Becker 1960; Pollack, Becker et al. 1960).

Las variaciones de la presión sanguínea son otro de los factores condicionantes de esta dinámica. Se ha comprobado que las restricciones del flujo sanguíneo carotideo promueven la disminución de la formación de HA en primates (Bill 1970).

De la misma manera, las situaciones transitorias hipoosmóticas, que pueden acontecer por la ingesta rápida y abundante de agua, promueven la formación del HA. El efecto antagónico se produce en situaciones hiperosmóticas, conllevando además una disminución paralela de la PIO (Beneyto Martín 1991).

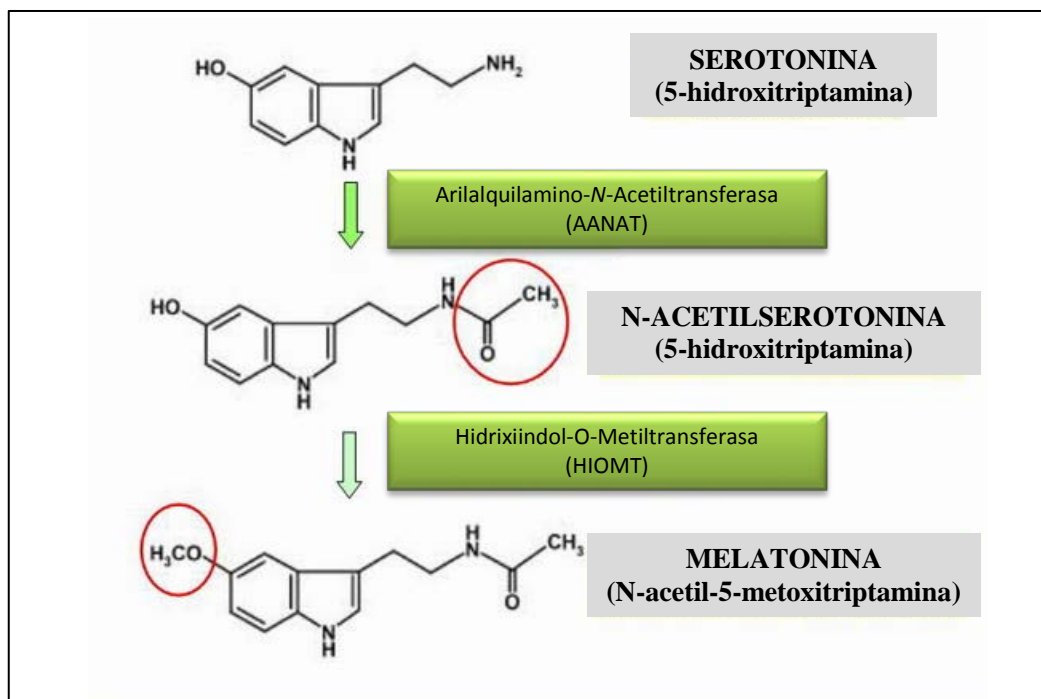
La edad, es otro de los factores que influyen en la dinámica del HA. Se estima que cada década de vida, se reduce aproximadamente un 2% la producción de HA (Brubaker, Nagataki et al. 1981). Paradójicamente, al mismo tiempo, la incidencia de la hipertensión ocular aumenta con la edad.

Sin embargo, probablemente uno de los factores más destacable y más estudiado, sea la variación de la PIO a lo largo del ciclo circadiano. En humanos los valores de PIO pueden reducirse hasta un 50% durante el ciclo nocturno (Reiss, Lee et al. 1984; Song, Lee et al. 2014) y estas variaciones se dan incluso en sujetos con hipertensión ocular (Liu and Weinreb 2014).

Las variaciones diarias de la PIO, en ciclos diurnos y nocturnos, siguen inherentemente las fluctuaciones circadianas de la neurohormona melatonina (Samples, Krause et al. 1988; Agorastos and Huber 2011).

#### 4. LA MELATONINA

La melatonina, o *N*-acetil-5-metoxitriptamina, es una indolamina sintetizada a partir de la serotonina por la acción consecutiva de la arilalquilamino-*N*-acetiltransferasa (AANAT) y la hidrixiindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT) (Fig. I.10) (Axelrod 1974). Se aisló inicialmente a partir de extracto pineal bovino en 1958, lo que permitió su caracterización estructural (Lerner, Case et al. 1958).



**Figura I.10. Síntesis de melatonina.**

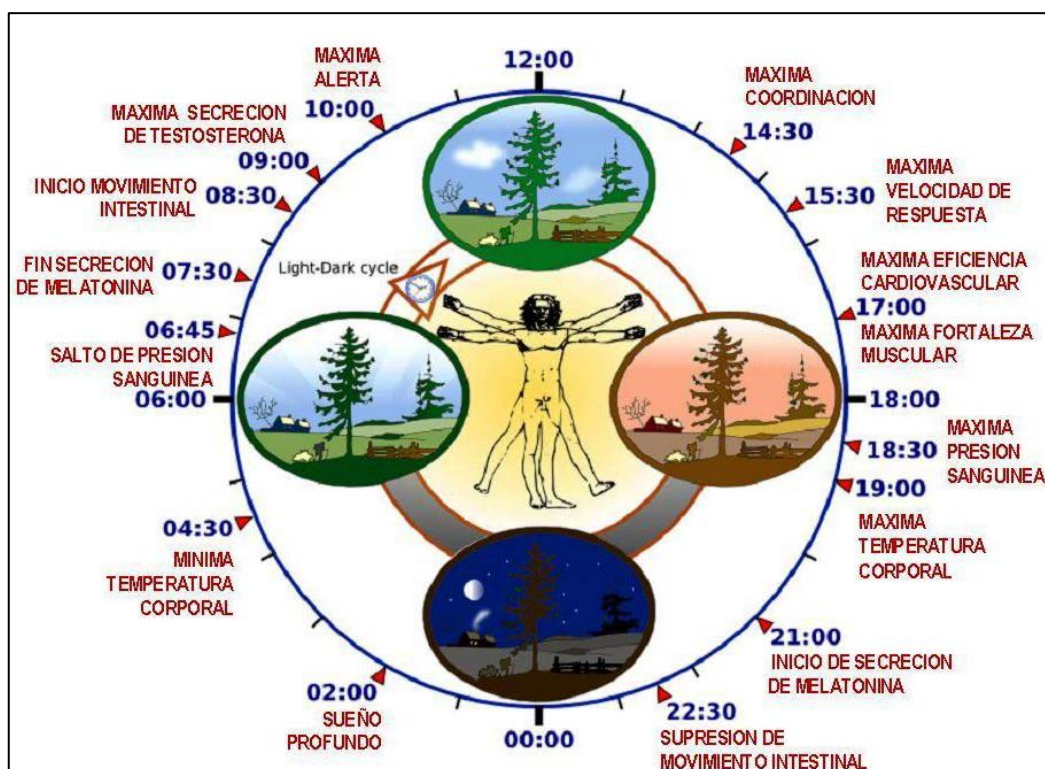
Esquema de la síntesis de melatonina a partir de serotonina. Detalle de los grupos químicos adicionados por AANAT e HIOMT

*Imagen modificada de cronobio.es*

Esta neurohormona está presente en todos los organismos tanto animales como vegetales, interviniendo en un gran número de procesos celulares y vías de regulación. Se ha descrito la participación de la melatonina como inmunomodulador (Carrillo-Vico, Guerrero et al. 2005), antidepresivo

(Beck-Friis, Kjellman et al. 1985; Quera Salva, Hartley et al. 2011; Kripke, Elliott et al. 2015; Pringle, Bogdanovskaya et al. 2015), antioxidante en procesos de envejecimiento (Oxenkrug, Requentina et al. 2001; Reiter, Tan et al. 2003), en la regulación de la maduración de los órganos sexuales (Kumanov, Tomova et al. 2005; Lewis, Middleton et al. 2006), en el desarrollo embrionario del ojo (Sampaio Lde 2008; Sampaio Lde 2009), como modulador de la presión arterial, mediada por catecolaminas (Sewerynek 2002), y como regulador de la presión intraocular (Pintor, Pelaez et al. 2003).

A pesar del gran número de procesos en los que interviene la melatonina su función más característica está ligada a la adaptación de los fotorreceptores a las diferentes condiciones lumínicas (Wiechmann, Vrieze et al. 2003) y fundamentalmente, a la regulación circadiana de los ciclos de luz-oscuridad (Fig. I.11) (Bartness and Goldman 1989) y estacionales (Arendt 1998).



**Figura I.11. Ciclo circadiano.**

Ilustración del esquema horario del ciclo circadiano con los principales acontecimientos fisiológicos. Imagen obtenida de [www.botiquinmagico.com](http://www.botiquinmagico.com)

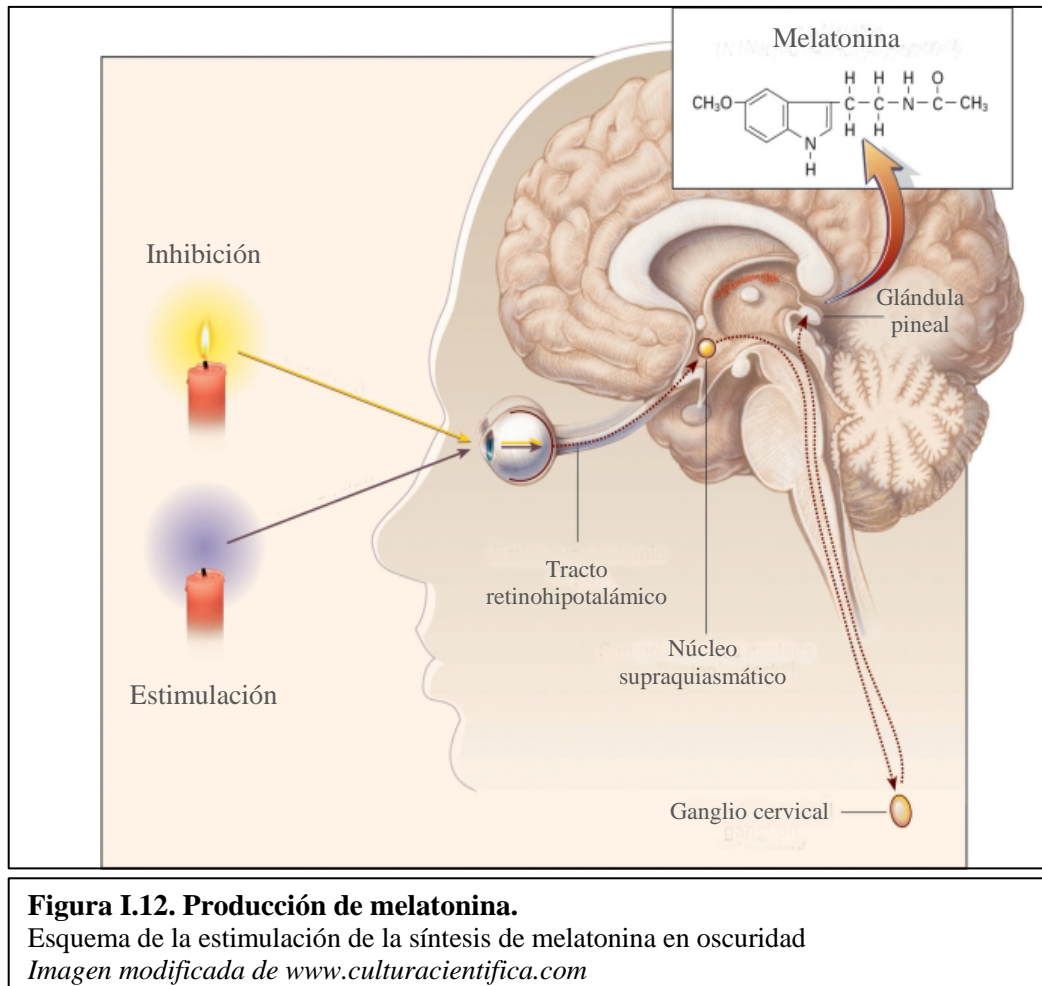
#### 4.1 PRODUCCIÓN DE MELATONINA

La estructura principal responsable de la generación de la melatonina es la glándula pineal o epífisis; presente en el en diencefalo (Moller and Baeres 2002). La epífisis, es una pequeña glándula endocrina, de 5-8 mm en humanos, compuesta principalmente por células de la neuroglia (Vollrath 1981) y pinealocitos; siendo estos últimos los responsables de la síntesis de melatonina.

Los sistemas que regulan la producción de melatonina en la glándula pineal, están íntimamente relacionados con la función circadiana de esta neurohormona. Bajo estimulación lumínica, las células fotorreceptoras de la retina se mantienen hiperpolarizadas; sin embargo en oscuridad la despolarización de estas células permite la liberación de noradrenalina (NA) hacia el núcleo supraquiasmático hipotalámico. Desde el núcleo supraquiasmático, el impulso recorre fibras simpáticas preganglionares hacia el ganglio cervical que inerva directamente la glándula pineal con fibras postganglionares secretoras de NA (Fig. 1.12) (Schomerus and Korf 2005). La liberación de NA en la glándula pineal estimula principalmente los adrenoreceptores  $\beta$  de los pinealocitos, lo que promueve la síntesis de melatonina asociada a un aumento intracelular del AMPc (Dominguez-Rodriguez, Abreu-Gonzalez et al. 2009; Domínguez-Rodríguez, Samimi-Fard et al. 2009) mediante el aumento de la actividad de la AANAT (Klein, Coon et al. 1997). De igual forma, la estimulación sinérgica de los adrenoreceptores  $\alpha_1$  contribuye, mediante el aumento de inositoles fosfato, a la liberación de melatonina por parte de los pinealocitos (Reiter 1991).

La glándula pineal vierte su secreción directamente en el torrente sanguíneo a través del cual la melatonina alcanza sus órganos diana. La secreción se realiza principalmente por difusión pasiva a medida que aumenta la producción. Ésta comienza poco después del inicio del periodo de oscuridad, alcanzando su pico máximo en sangre (60-200 pg/ml en humanos) en la mitad del ciclo nocturno. A partir de este punto la concentración de melatonina sérica desciende gradualmente hasta alcanzar los niveles del ciclo diurno (10-20

pg/ml) (Reiter 1991). La melatonina sérica se encuentra, mayoritariamente, unida a proteína, y solo una pequeña parte circula de forma libre por el torrente sanguíneo. Finalmente la melatonina alcanza el hígado, donde es transformada a metabolitos de desecho urinario.



A pesar de que la glándula pineal es el principal órgano secretor de melatonina en los vertebrados, existen otras estructuras fisiológicas ligadas a su producción (Lerner, Case et al. 1959). Se ha descrito producción local de melatonina en el timo, ligada a su desarrollo embrionario (Jimenez-Jorge, Jimenez-Caliani et al. 2005), síntesis extrapineal en el epitelio respiratorio (Kvetnoy 1999), en médula ósea, donde los niveles de melatonina son muy elevados (Tan, Manchester et al. 1999; Conti, Conconi et al. 2000), en el tracto intestinal (Huether, Poeggeler et al. 1992; Huether 1993), en los órganos reproductores (Tijmes, Pedraza et al. 1996; Itoh, Ishizuka et al. 1999), en placenta humana, donde actúa como regulador funcional (Iwasaki, Nakazawa

et al. 2005), en linfocitos humanos, donde su síntesis podría tener una función autocrina o paracrina relacionada con procesos locales inflamatorios (Carrillo-Vico, Guerrero et al. 2005).

En ninguno de estos casos se ha podido relacionar la síntesis de melatonina con un patrón circadiano, por lo que esta producción extrapineal se relaciona más con procesos locales y protección frente al estrés oxidativo (Tan, Manchester et al. 2003).

Un caso más particular de producción extrapineal, lo encontramos en las estructuras anejas al ojo; como las glándulas de Harder (Menendez-Pelaez, Howes et al. 1987) y estructuras oculares como el cristalino (Abe, Itoh et al. 1999), la retina (Iuvone and Besharse 1983) y el cuerpo ciliar (Martin, Malina et al. 1992).

#### 4.1.1 Estructuras productoras de melatonina en el ojo

Al igual que en otros órganos, la producción de melatonina extrapineal en el ojo parece tener una marcada función local; sin embargo, en el ojo, la síntesis de melatonina mantiene un ciclo circadiano. La estructura ocular mejor estudiada en este sentido es la retina.

Inicialmente se consideraba que la melatonina presente en la retina era de origen pineal, dada la alta vascularización de esta estructura. Sin embargo, hoy sabemos que existe una producción activa de esta neurohormona, que además, mantiene el ciclo circadiano (Tosini and Fukuhara 2002; Zawilska, Lorenc et al. 2006).

A pesar de la complejidad celular presente en la retina, se ha identificado la síntesis de melatonina en los fotorreceptores, probablemente los conos, (Tosini and Fukuhara 2003). La regulación de esta producción local es independiente de la glándula pineal, por lo que la retina posee su propio reloj circadiano independiente de la glándula pineal (Tosini 2000).

La función de esta producción local en la retina es desconocida, pero las concentraciones de melatonina halladas en retina de roedor (2 pg/mg de proteína) parecen ser adecuadas para la activación de los receptores de melatonina (Chanut, Nguyen-Legros et al. 1998), por lo que se postula su acción como neuromodulador o neurohormona autocrina (Tosini and Fukuhara 2003).

Otras estructuras oculares involucradas en la síntesis de melatonina son el cristalino y los procesos ciliares. El cristalino es una estructura avascular, y por lo tanto aislada de la melatonina de origen pineal, en la que se ha detectado actividad de las enzimas AANAT e HIOMT, y variaciones circadianas en la concentración de melatonina (Abe, Itoh et al. 1999). Estos datos, sugieren una posible síntesis local de melatonina.

Al igual que en el cristalino y la retina, los procesos ciliares cuentan con toda la maquinaria necesaria para la síntesis de melatonina. Este hecho no es sorprendente, teniendo en cuenta que el cuerpo ciliar y la retina tienen un origen embriológico similar. Tanto en procesos ciliares como en el humor acuoso que lo rodea, se han detectado indolaminas y actividad enzimática de AANAT e HIOMT (Martin, Malina et al. 1992). En procesos ciliares humanos se han hallado también metabolitos intermediarios de la síntesis de melatonina como el 5-hidroxitriptófano y la *N*-acetilserotonina; lo que sugiere un metabolismo activo de esta vía (Martin, Malina et al. 1992). En el mismo sentido, se ha constatado la presencia de melatonina en humor acuoso humano en concentraciones muy significativas (Chiquet, Claustrat et al. 2006).

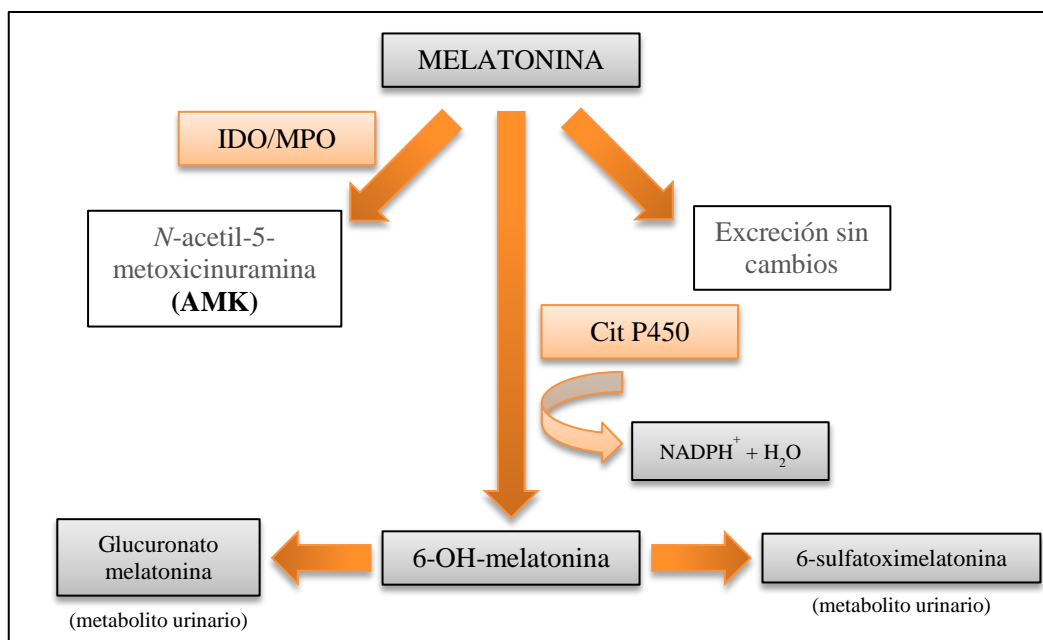
Estos hallazgos son de una gran trascendencia en la regulación de la presión intraocular, si consideramos que ésta también presenta fluctuaciones circadianas, y que la melatonina ha sido descrita como uno de sus moduladores (Pintor, Martin et al. 2001).

Un caso curioso de estructura productora de melatonina, aneja al ojo, es la glándula de Harder (Djeridane, Vivien-Roels et al. 1998). Es una glándula

sebácea que actúa como accesoria de la glándula lagrimal en roedores y lagomorfos (Kittner, Olah et al. 1978), facilitando la lubricación de un tercer párpado. La producción de melatonina es así vertida en el contenido lagrimal en concentraciones adecuadas para la estimulación de los receptores de melatonina presentes en la superficie ocular (Mhatre, van Jaarsveld et al. 1988).

#### 4.2 DEGRADACION DE LA MELATONINA

Como ya hemos visto, la mayor parte de la melatonina es producida por la glándula pineal, y vertida al torrente sanguíneo, a través del cual alcanza los órganos diana, para finalmente ser degradada por el hígado. Al alcanzar éste, la melatonina es metabolizada por el citocromo P450 transformándose en 6-hidroximelatonina, que es conjugada principalmente a derivados sulfatados, o de forma minoritaria a derivados glucoronizados (Cardinali 1981). Finalmente, estos derivados pueden ser eliminados en forma de 6-sulfatoximelatonina como desecho urinario (Fig. I.13) (Markey, Higa et al. 1985).



**Figura I.13. Degradación de la melatonina.**

Esquema de los diferentes mecanismos seguidos por la melatonina para su degradación.

Si bien la ruta hepática es la principal responsable de la degradación de melatonina en el organismo, se han encontrado diferentes metabolitos de degradación de esta neurohormona en otros órganos como intestino, piel y sistema nervioso central.

#### 4.2.1 Metabolitos extrahepáticos de melatonina

Uno de los metabolitos de origen no hepático más abundante es la 6-hidroximelatonina. A diferencia de la generada en hígado, la 6-hidroximelatonina puede también producirse por la interacción directa de la melatonina con especies oxidantes del oxígeno y del nitrógeno (Zhang, Squadrito et al. 1998; Zhang, Squadrito et al. 1999). Al igual que la melatonina, tiene una gran capacidad antioxidante como recolector de radicales libres y como protector del ADN frente al estrés oxidativo (Liu, Chen et al. 2002; Maharaj, Limson et al. 2003; Matuszak, Biliska et al. 2003).

Al igual que en el caso anterior, la 3-hidroximelatonina cíclica es generada por la acción directa de especies oxidantes, radical hidroxilo y peroxinitrito, sobre la melatonina (Tan, Manchester et al. 1998; Zhang, Squadrito et al. 1999; Peyrot, Houee-Levin et al. 2006). La 3-hidroximelatonina presenta un gran parecido estructural con la fisostigmina (inhibidor de la colinesterasa), por lo que se ha postulado su utilización terapéutica en el tratamiento de algunas enfermedades como el Alzheimer (Lahiri, Chen et al. 2005). Es, además, capaz de reaccionar con especies reactivas del nitrógeno y el oxígeno, generando a su vez N1-acetil-N2-formil-5-metoxicinuramina (AFMK) (Bonfont-Rousselot, Collin et al. 2011). Entre ambas moléculas se establece un equilibrio, que responde a las concentraciones endógenas de oxidantes; por lo que el ratio entre ambas moléculas es un buen indicativo del nivel endógeno de estrés oxidativo.

El AFMK es probablemente el principal metabolito de la melatonina. Evolutivamente el AFMK es anterior a la aparición de la 6-sulfatoximelatonina,

que como ya hemos visto es el principal metabolito urinario de la melatonina. Este hecho hace que se considere al AFMK como el metabolito ancestral de la melatonina. La aparición de la 6-sulfatoximelatonina, respondería por lo tanto a la necesidad un metabolito de deshecho más hidrosoluble para su expulsión por las vías urinarias.

Existen múltiples vías para la generación del AFMK. A partir de la melatonina se puede sintetizar por vía enzimática o pseudoenzimática; por irradiación UVA o por reacción directa con especies reactivas del oxígeno, aunque su producción mayoritaria se realiza por acción del citocromo c mitocondrial (Semak, Naumova et al. 2005). Su distribución en el organismo es muy amplia, encontrándose en leucocitos, eritrocitos, pulmones y piel, y en algunos tejidos como el sistema nervioso central constituye el principal metabolito de la melatonina.

La capacidad antioxidante del AFMK es muy parecida a la de la melatonina (Maharaj, Anoopkumar-Dukie et al. 2002), interviniendo en procesos detoxificantes, reduciendo la peroxidación lipídica, el daño al ADN, el daño neuronal inducido por peróxido de hidrógeno y péptido beta amiloide (Burkhardt, Reiter et al. 2001; Tan, Manchester et al. 2001; Onuki, Almeida et al. 2005; Srinivasan, Pandi-Perumal et al. 2006). A las capacidades antioxidantes del AFMK se suman las de uno de sus productos de degradación, el N-acetil-5-metoxicinuramina (AMK), cuya capacidad antioxidante es aún mayor (Ressmeyer, Mayo et al. 2003; Galano, Tan et al. 2013). El AMK disminuye la concentración de óxido nítrico neuronal, inhibiendo la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Entrena, Camacho et al. 2005; Leon, Escames et al. 2006). Ambas moléculas presentan actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora. El AMK inhibe la producción de prostanglandinas (Kelly, Amato et al. 1984), mientras que el AFMK es capaz de inhibir el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  e interleucina 8 en neutrófilos (Silva, Rodrigues et al. 2004), y ambas moléculas son capaces de inhibir la producción de la enzima proinflamatoria cicloxigenasa 2 (Mayo, Sainz et al. 2005).

El hecho de que tanto la melatonina, como sus metabolitos posean capacidad antioxidante; ya sea como recolectores de radicales libres, o como

moduladores de otros mecanismos de protección ante el estrés oxidativo, pone de manifiesto la importancia del papel de esta neurohormona en los mecanismos protectores antioxidantes fisiológicos.

### 4.3 RECEPTORES DE MELATONINA

Las acciones de la melatonina en los mecanismos reguladores y de señalización intracelular son muy diversas. Algunas de estas acciones se deben a una interacción directa de la melatonina con moduladores o intermediarios de señalización intracelular. Este es el caso de la inhibición de la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a la calmodulina (Benitez-King and Anton-Tay 1993), que regula la inactivación de la adenilato ciclasa (AC). Para otras acciones, como la inhibición del sistema NOS o de la lipooxigenasa ( LOX), que desembocaría en la inactivación de la guanilato ciclasa (GC) y en la acumulación de ácido araquidónico (AA) respectivamente, aún no se ha determinado la identidad del receptor de melatonina implicado o su mecanismo de acción. Sin embargo, la mayoría de la funciones de la melatonina están mediadas por receptores específicos de melatonina.

#### 4.3.1 Receptores nucleares

Aunque se dispone de poca información sobre los receptores nucleares de melatonina, se han identificado varios receptores huérfanos pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares RZR/ROR (Mor, Plazzi et al. 1999).

Entre los receptores identificados se encuentran los receptores RZR/ROR $\alpha$ , expresado de forma profusa en diferentes órganos y tejidos, el RZR/ROR $\beta$ , específico de encéfalo y retina (Smirnov 2001), y el RZR/ROR $\gamma$ , que aunque encontrado en diferentes tejidos, presenta su mayor índice de expresión en el músculo esquelético (Hirose, Smith et al. 1994).

Sabemos que parte de las acciones de la melatonina son mediadas por este tipo de receptores, que actúan en la regulación de diversos genes. Uno de los genes cuya transcripción se ha descrito como modulada por melatonina es el que codifica para la enzima 5-lipoxigenasa, implicada directamente en reacciones alérgicas e inflamatorias (Carlberg and Wiesenberg 1995). De igual forma ha sido descrita como diana de estos receptores nucleares las regiones reguladoras de otros genes como el p21WAF1/CIP1, apolipoproteína A-1, N-myc o la proteína 2 de células de Purkinje (Wiesenberg, Missbach et al. 1998).

. El estudio en este nuevo campo ha revelado interacciones hasta ahora no sospechadas de la melatonina con diferentes enzimas, extendiendo aún más los campos sobre los que la melatonina actúa como regulador.

#### 4.3.2 Receptores de membrana

Como ya mencionamos anteriormente, la mayoría de las acciones realizadas por la melatonina, son mediadas a través de receptores de membrana pertenecientes a la familia de proteínas de siete dominios transmembrana acopladas a proteína G (GPCR) (Morgan, Lawson et al. 1989).

Actualmente han sido descritos tres tipos de receptores de melatonina en mamíferos, denominados, según nomenclatura adaptada a la *International Union of Pharmacology* (IUPHAR), como  $MT_1$ ,  $MT_2$  y  $MT_3$  (Dubocovich, Cardinali et al. 1998).

Tanto el receptor  $MT_1$  (Reppert, Weaver et al. 1994; Roca, Godson et al. 1996) como el  $MT_2$  (Reppert, Godson et al. 1995), han sido identificados y clonados. Un caso particular lo presenta el receptor  $MT_3$ , caracterizado farmacológicamente, pero cuya estructura molecular es desconocida (Dubocovich, Masana et al. 2000). El receptor  $MT_3$  fue purificado por afinidad a partir de riñón de hámster en 2000 (Nosjean, Ferro et al. 2000), sin embargo, incluso hoy en día sigue existiendo controversia sobre las características, funciones e identidad de este receptor.

Los receptores de melatonina identificados en especies no mamíferas, mantienen de forma habitual la nomenclatura clásica. En ésta, se distinguen receptores de alta afinidad a melatonina (orden picomolar) denominados ML1, y receptores de baja afinidad (orden nanomolar), denominados ML2 (Dubocovich 1995). Dentro de los receptores de alta afinidad han sido identificados los receptores Mel1a, Mel1b y Mel1c. Tanto Mel1a como Mel1b presentan secuencias homólogas a los receptores de mamíferos  $MT_1$  y  $MT_2$  respectivamente (von Gall, Stehle et al. 2002), sin embargo, a pesar de haber sido clonado en diferentes especies (Ebisawa, Karne et al. 1994; Reppert, Weaver et al. 1995), no ha sido hallado el ortólogo en mamíferos para el receptor Mel1c (Reppert 1997).

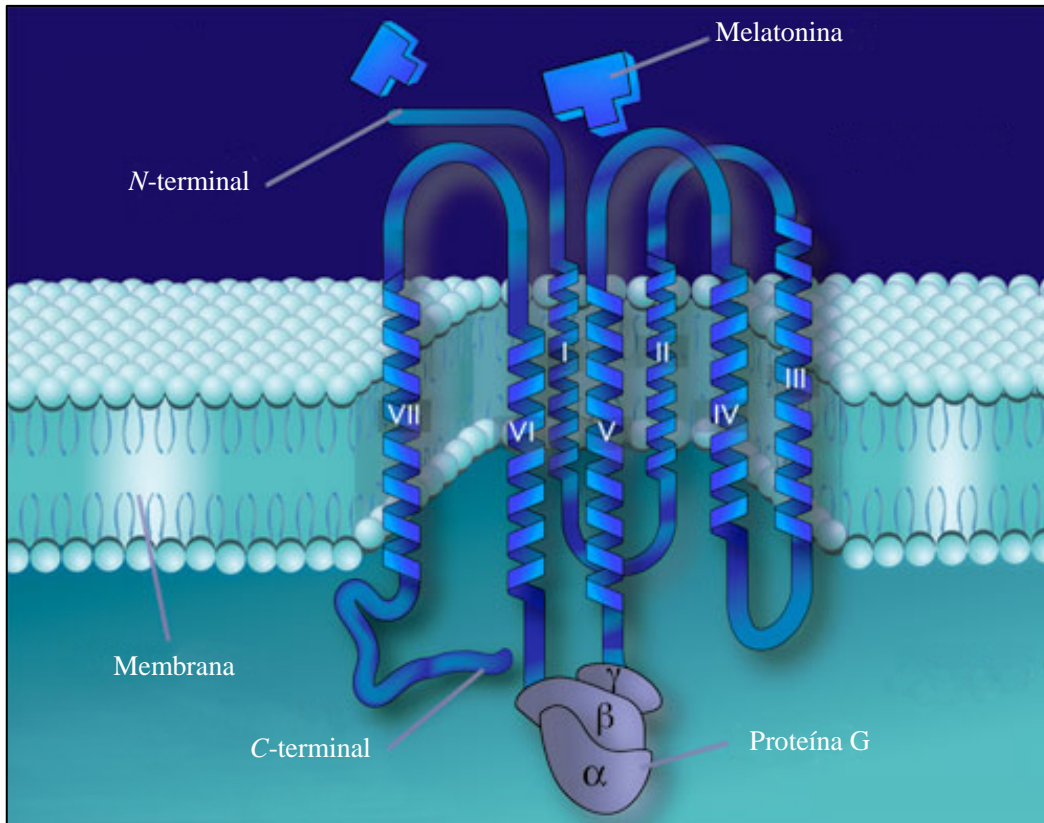
Los receptores ML2 de baja afinidad fueron inicialmente detectados en cerebro de hámster (Ebisawa, Karne et al. 1994) y presentan un perfil farmacológico diferente a los ML1 (Dubocovich 1988). Se ha correlacionado a los receptores ML2 de baja afinidad con el receptor de mamíferos  $MT_3$  (von Gall, Stehle et al. 2002), sin embargo al no existir una identificación molecular de dicho receptor, tal correlación es actualmente tema de discusión.

#### 4.3.2.1 Estructura molecular

Tanto el receptor  $MT_1$  como el receptor  $MT_2$  se clasifican como receptores acoplados a proteína G (GPCRs) pertenecientes a la clase A de tipo rodopsina [www.gpcr.org/7tm].

Su estructura presenta siete hélices de marcado carácter hidrofóbico, que se corresponden a siete dominios transmembrana, conectados entre sí, por tres regiones extracelulares y tres intracelulares (Fig. I.14) (Wess 1993). La configuración de estas secuencias sugiere la presencia de sitios potencialmente fosforilables o susceptibles de glicosilación. En este sentido, para el receptor  $MT_1$  se han hallado dos sitios susceptibles de glicosilación en la región N-terminal (Navajas, Kokkola et al. 1996) y se presume que este

receptor podría existir de forma funcional en más de una forma glicosilada (Reppert, Weaver et al. 1994; Reppert, Weaver et al. 1996). Por otra parte, el receptor  $MT_2$  únicamente presenta un sitio susceptible de glicosilación en la región N-terminal (Navajas, Kokkola et al. 1996; Reppert, Weaver et al. 1996).



**Figura I.14. Estructura de los receptores de melatonina.**

Esquema de receptor de melatonina donde se muestra la disposición de los siete dominios transmembrana, las regiones intracelulares y extracelulares y el acoplamiento a proteína G. Imagen modificada de [www.hivehealthmedia.com](http://www.hivehealthmedia.com)

El receptor  $MT_1$  está compuesto por 350 aminoácidos, con un peso molecular de 39 KDa y el gen que codifica este receptor se localiza en la posición 4q35-1 (Slaugenhaupt, Roca et al. 1995). El receptor  $MT_2$ , está compuesto por 362 aminoácidos, con un peso aproximado de 40 KDa. El gen que codifica para el receptor  $MT_2$  se localiza en la posición 11q21-22 [Reppert et al., 1995a]. Ambos receptores presentan una homología del 60% [Reppert et al., 1996].

Como ya hemos mencionado el receptor  $MT_3$  presenta particularidades dentro de los receptores de melatonina. Su identificación se realizó mediante estudios funcionales y de unión (Nosjean, Ferro et al. 2000). Dichos estudios

situaban el receptor  $MT_3$  como perteneciente a la familia de quinonas reductasas, concretamente la quinona reductasa 2 (NQO2). Se ha reconocido a esta enzima funciones en procesos de detoxificación, relacionando la NQO2 con el papel antioxidante ya descrito de la melatonina, sin embargo, resulta difícil establecer un papel concreto de esta enzima en la función antioxidante (Vella, Ferry et al. 2005).

De esta forma se inicia una controversia sobre la identidad del receptor putativo  $MT_3$ . Si bien en algunos modelos *knock-out* para el gen de NQO2, se constató la desaparición de sitios de unión de baja afinidad para melatonina (correspondiente a  $MT_3$ ) (Mailliet, Ferry et al. 2004), existen otros modelos en los que no se ha podido equiparar la identidad NQO2 -  $MT_3$  (Nosjean, Nicolas et al. 2001; Alarma-Estrany, Crooke et al. 2009).

En este mismo sentido se ha comprobado que la unión de melatonina o derivados a la enzima, no inhibe la actividad de esta cuando su sustrato natural, la menadiona, se encuentra unida a su centro activo (Mailliet, Ferry et al. 2004). De la misma forma, han sido descritas correlaciones entre el perfil farmacológico del receptor  $MT_3$  (tanto en no mamíferos como mamíferos) y la generación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (Eison and Mullins 1993; Mullins, Fernandes et al. 1997). De igual manera, el 5-metoxi-carbonilamino-*N*-acetiltriptamina (5-MCA-NAT), agonista selectivo del receptor  $MT_3$ , es capaz de activar la síntesis de AMPc en retina de pollo. (Sampaio Lde 2009). Todos estos descubrimientos parecen refutar dicha identidad.

En 2009, los experimentos realizados por Alarma-Estrany, demostraron que tras abolir, mediante el uso de ARN de interferencia (siRNA), la presencia de NQO2, éste agonista selectivo del receptor  $MT_3$ , mantenía sus efectos hipotensores intactos; dando un nuevo impulso a esta controversia (Alarma-Estrany, Crooke et al. 2009).

En 2010 un nuevo estudio sobre el agonista 5-MCA-NAT, cuestionó la selectividad específica de éste por el receptor  $MT_3$ ; atribuyendo las acciones

biológicas anteriormente descritas a su papel como potente agonista parcial de los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> en rangos sub-micromolares (Vincent, Cohen et al. 2010).

Este estudio demuestra la capacidad del 5-MCA-NAT para activar los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, sin embargo dada la promiscuidad en la activación de segundos mensajeros y señalización intracelular atribuida a los receptores de melatonina, resulta difícil atribuir acciones biológicas específicas a estos receptores; debiendo admitir la posibilidad de desconocidas vías de señalización o la existencia de nuevos receptores aún no descritos.

#### 4.3.2.2 Vías de señalización y mediadores intracelulares

Existe una bien establecida vía clásica de señalización intracelular para los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>. Como ya hemos mencionado, estos receptores pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (GPCRs) (Fig. 1.14) (Morgan, Lawson et al. 1989; Reppert 1997; von Gall, Stehle et al. 2002; Rivara, Lorenzi et al. 2005).

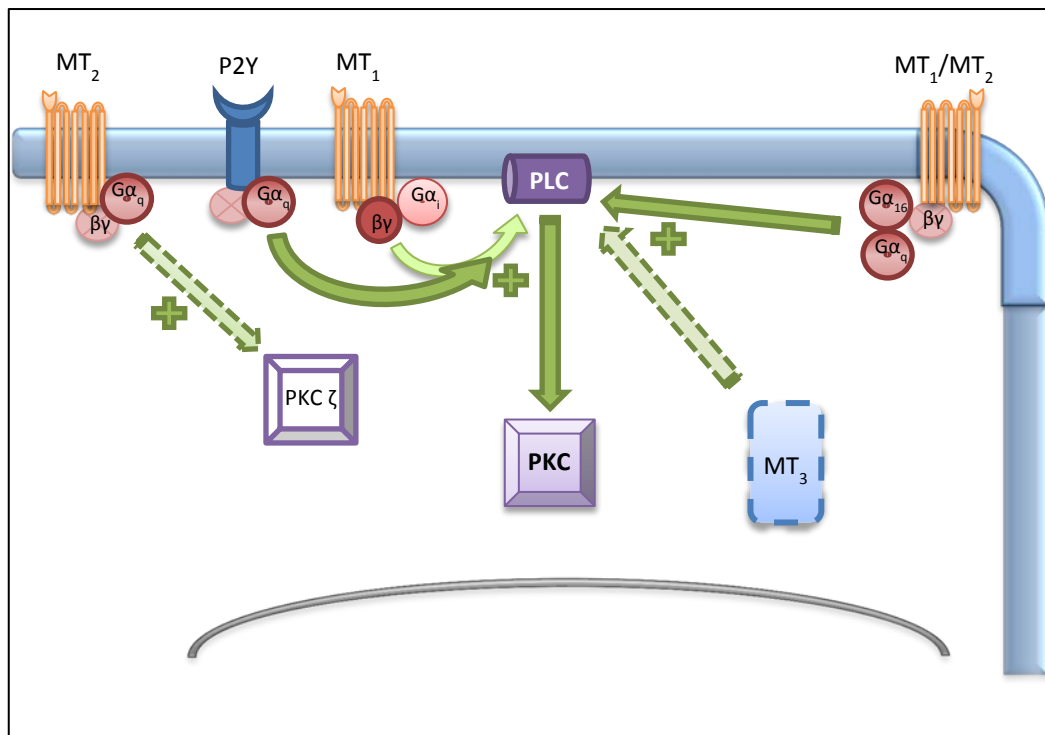
De forma clásica, la estimulación de los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, desembocaría en la inactivación de la adenilato ciclasa (AC) (von Gall, Stehle et al. 2002) en un proceso mediado por la subunidad G $\alpha_i$  de la proteína G acoplada al receptor de membrana. La inactivación de la AC comportaría una disminución de la concentración de AMPc intracelular, y finalmente, una disminución de proteína quinasa A (PKA) activada. Se ha demostrado que la acción de estos receptores inhibe la formación de AMPc inducida por forskolina (forsk) (Vanecek 1998).

Sin embargo, dependiendo del tejido, órgano o especie estudiada, los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> son capaces de activar cascadas de señalización muy diferentes. En la línea celular HEK293 el receptor MT<sub>1</sub> ha sido implicado en la activación de la fosfolipasa C- $\alpha$  (PLC- $\alpha$ ) (Brydon, Roka et al. 1999); mientras que el receptor MT<sub>2</sub>, además de inhibir de forma clásica la AC, ha sido descrita en procesos de inhibición de la enzima guanilato ciclasa (GC) (Petit, Lacroix et al. 1999).

La plasticidad en la transducción de señales demostrada por los receptores de melatonina está, al menos parcialmente, relacionada con su capacidad para asociarse con diferentes tipos de proteína G. Se sabe que los receptores clonados de melatonina son capaces de unirse a proteínas  $G_i$  subtipos del 1-3,  $G_z$  y posiblemente a  $G_s$  (Wong 1996). De hecho, la activación de  $G_s$  ha sido confirmada recientemente para el receptor  $MT_1$  en células epiteliales de próstata humana (Shiu, Pang et al. 2010; Chen, He et al. 2014). De igual forma  $MT_1$  y  $MT_2$ , pero no  $Mel_{1c}$ , han demostrado capacidad de asociarse a proteína  $G_{16}$  en células COS-7 transfectadas (Mody, Ho et al. 2000; Lai, Mody et al. 2002). La activación de la fosfolipasa C (PLC) por estimulación mediante melatonina, sugería también una posible asociación de estos receptores con proteína  $G_q$ ,  $G_{11}$  o  $G_{14}$  (New, Tsim et al. 2003). La activación de  $G_q$  ha sido demostrada para el receptor  $MT_1$  en músculo liso gastrointestinal, asociada a una activación de la PLC y a un aumento de la hidrólisis de fosfatidilinositol (PI) y  $Ca^{2+}$  intracelular (Ahmed, Mahavadi et al. 2013). De igual manera el receptor  $MT_2$  es capaz de activar la  $PKC\zeta$  en un proceso asociado a la activación de  $G_q$  en células mesenquimales (Lee, Jung et al. 2014).

#### 4.3.2.2.1 Vías de señalización PLC/PKC

La  $PLC\beta$  es una enzima que participa en el metabolismo de los fosfatidilinositoles (PI) y la señalización intracelular medida por  $Ca^{2+}$ . La activación de esta enzima se ha asociado a diferentes subunidades de proteína G:  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$ ,  $G\alpha_{14}$ ,  $G\alpha_{15}$ ,  $G\alpha_{16}$ , y a las subunidades  $G\beta\gamma$  (Rebecchi and Pentylala 2000). Existe una amplia bibliografía que demuestra la activación de esta vía mediada por melatonina, en diversos modelos celulares (Eison and Mullins 1993; Popova and Dubocovich 1995; Mullins, Fernandes et al. 1997; Benitez-King, Hernandez et al. 2001). Como ya hemos mencionado, trabajos recientes en este campo han demostrado que la interacción entre receptores de melatonina y la PLC es mediada por la proteína  $G_q$  (Fig. I.15) (Ahmed, Mahavadi et al. 2013; Lee, Jung et al. 2014). A esta vía de activación se une la ya reseñada mediada por  $G_{16}$ . Sin embargo, estos no son los únicos mecanismos que posibilitan la activación de PLC/PKC.



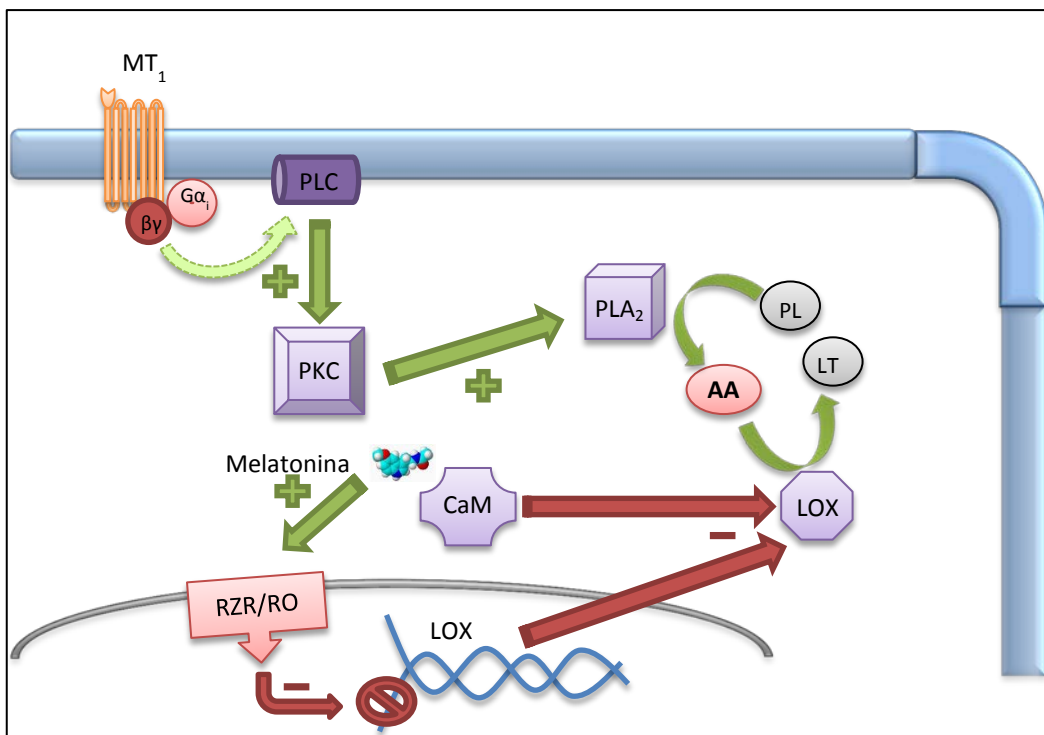
### Figura I.15. Vías de señalización. PLC/PKC

Esquema gráfico de la regulación de la actividad de la PLC/PKC asociada a la melatonina y sus receptores. Podemos diferenciar dos vías principales, mediadas por G $\alpha_q$  o por subunidades  $\beta\gamma$  de G $\alpha_i$ . Las flechas discontinuas representan mediaciones para las que aún no se ha definido el mecanismo de acción.

Antes del descubrimiento de la asociación de receptores de melatonina con proteína G $\alpha_q$ , se postuló un mecanismo alternativo mediado por las subunidades G $\beta\gamma$  (New, Tsim et al. 2003). Existen múltiples ejemplos de activación de esta vía mediados por subunidades G $\beta\gamma$  de receptores asociados a proteína G $\alpha_i$  (Tsu, Lai et al. 1995). De hecho, existen sistemas, en los que la activación de la vía PLC/PKC por receptores de melatonina queda abolida por la acción de la toxina pertúsica, lo que implica directamente la intermediación de una proteína G $\alpha_i$  (McArthur, Hunt et al. 1997; MacKenzie, Melan et al. 2002). En el mismo sentido, un efecto descrito en la literatura es la potenciación de la activación de la PLC, preactivada mediante G $\alpha_q$ , mediada por proteína G $\alpha_i$  (Chan, Lee et al. 2000). Este efecto ha sido observado en células HEK-293 en los que se ha constatado una potenciación de la activación de la PLC cuando se estimulan simultáneamente los receptores MT<sub>1</sub> y los receptores P2Y, acoplados a proteína G $\alpha_q$  (Fig. I.15) (Abe, Itoh et al. 1999).

#### 4.3.2.3.2 Vías de activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>

La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) cataliza la hidrólisis de fosfolípidos a ácido araquidónico (AA) en respuesta a varias señales reguladoras (Lin, Lin et al. 1992). El AA interviene como segundo mensajero en multitud de procesos mediados por GPCR, apuntando una posible vía de señalización para los receptores de melatonina.



**Figura I.16. Vías de señalización. PLA<sub>2</sub>/LOX.**

Esquema gráfico de la regulación de la actividad de la PLA<sub>2</sub>/LOX asociada a la melatonina y sus receptores en la producción y degradación del ácido araquidónico (AA) como segundo mensajero. Las flechas discontinuas representan mediaciones para las que aún no se ha definido el mecanismo de acción.

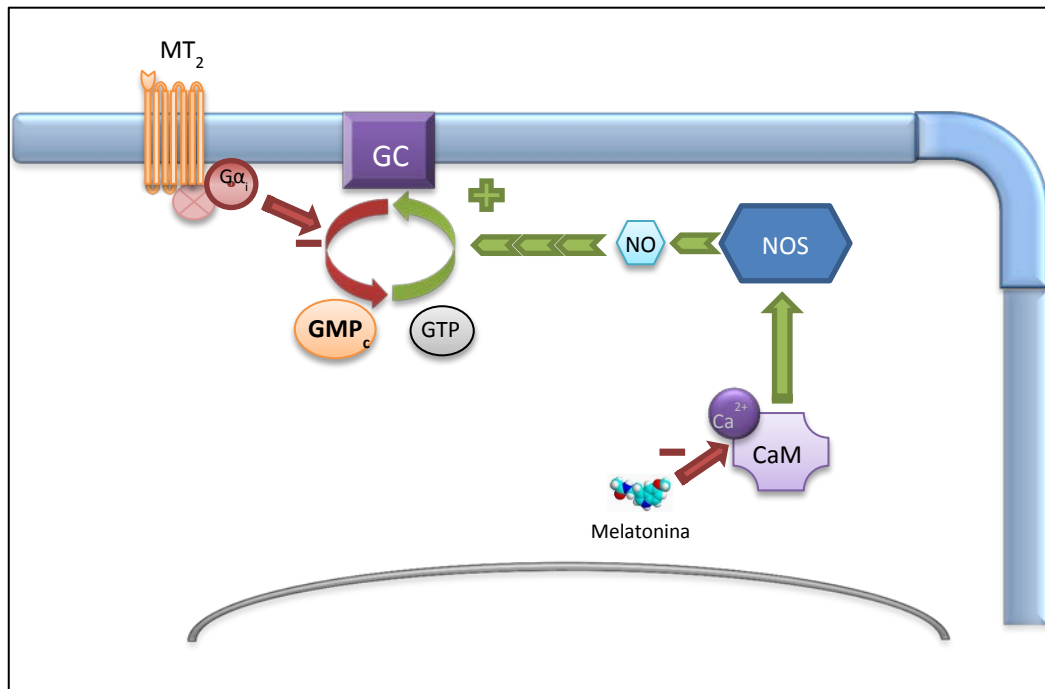
En células NIH-3T3, con sobreexpresión de receptores MT<sub>1</sub>, se constató que la melatonina era capaz de aumentar la secreción de AA, cuando la PLA<sub>2</sub> era preactivada, no así la secreción basal (Godson and Reppert 1997). Este efecto era abolido en presencia de toxina pertúsica e inhibidores de la PKC, lo que apunta a la mediación de proteína G<sub>i</sub> y la transducción de señal a través de la PKC activada (Fig. I.16).

De forma complementaria, la melatonina podría regular el catabolismo del AA, impidiendo su degradación hacia leucotrienos, y por lo tanto aumentando sus niveles intracelulares. La enzima implicada en esta degradación, la lipoxigenasa (LOX), es inhibida mediante melatonina (Martinuzzo, Del Zar et al. 1991), que además, ha demostrado su capacidad para inhibir la transcripción génica de algunos subtipos de LOX mediante la activación de receptores nucleares RZR/ROR (Fig. I.16) (Steinhilber, Brungs et al. 1995). La relación existente entre la generación de AA, la PLA<sub>2</sub> y la activación de LOX, aunque con resultados parcialmente contradictorios, ha sido corroborada en leucocitos (Radogna, Sestili et al. 2009). Este trabajo apunta la interacción de melatonina con CaM, como iniciador de esta vía de señalización, relacionándola además con el metabolismo de radicales libres, e introduciendo una nueva posible vía de transducción de señales.

Las parciales contradicciones encontradas en la activación de PLA<sub>2</sub> y LOX, podrían indicar que los receptores de melatonina utilizan diferentes vías de señalización para la regulación de la PLA<sub>2</sub>.

#### 4.3.2.2.3 Vías de señalización a través de guanilato ciclasa

La guanilato ciclasa (GC) cataliza la formación del GMPc. Este actúa como un importante segundo mensajero en una gran variedad de procesos fisiológicos. Se ha constatado que existen variaciones intracelulares de este segundo mensajero acompañadas a los ritmos circadianos, y que estas fluctuaciones son debidas a efectos inhibitorios de la melatonina (Vanecek and Vollrath 1989; Gilad, Matzkin et al. 1997; Bubis and Zisapel 1999). De hecho, la inhibición en la acumulación de GMPc producida por la melatonina es mediada únicamente por el receptor MT<sub>2</sub>, estableciendo por primera vez una diferencia entre los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> en sus vías de señalización (Fig. I.17) (Bubis and Zisapel 1999; Petit, Lacroix et al. 1999).



### Figura I.17. Vías de señalización. GMP<sub>c</sub>

Esquema gráfico de la regulación de la actividad de la guanilato ciclasa asociada al receptor  $MT_2$  mediada por proteína Gi. Alternativamente la melatonina podría regular el sistema a través de la CaM y el sistema NOS.

De forma alternativa, la melatonina podría inhibir la actividad de la GC a través del sistema óxido nítrico sintasa (NOS) y la producción de óxido nítrico (NO). La NOS es activada por CaM (Aoyagi, Arvai et al. 2003), con el subsiguiente aumento de NO intracelular. Éste, es conocido por ser un potente activador de la GC (Spessert, Layes et al. 1993). Aunque el mecanismo de acción de la melatonina sobre NOS aún no ha sido elucidado, la melatonina, por acción directa, es capaz de inhibir la unión del  $Ca^{2+}$  a la calmodulina, lo que desembocaría en una disminución de la actividad de la GC (Fig. I.17) (New, Tsim et al. 2003).

Esta vía se vio refrendada parcialmente por los experimentos de Dortch-Carnes y Tosini de 2013 en células inmortalizadas de epitelio ciliar no pigmentado (Dortch-Carnes and Tosini 2013). En dichos experimentos se demuestra la disminución de NO y de GMPc por acción de la melatonina y diferentes análogos como el 5-MCA-NAT y el IIK7; si bien dicho efecto está asociado al receptor  $MT_2$ , y no a la interacción con la CaM.

A pesar de que este trabajo demuestra la mediación específica del receptor  $MT_2$ , aún no queda establecida la forma en la que este receptor regula el sistema NOS, por lo que serán necesarios futuros trabajos para elucidar la vía de señalización completa y los efectos fisiológicos que desencadena.

#### 4.3.2.2.3 Vías de señalización a través de la adenilato ciclasa

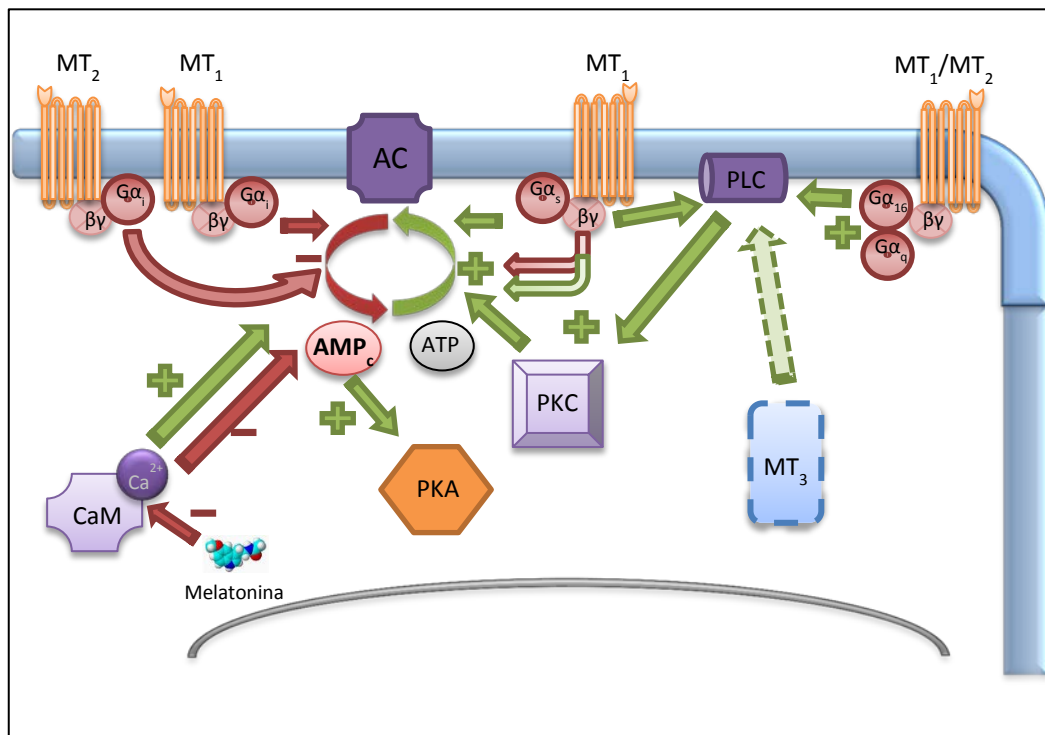
La adenilato ciclasa es una enzima, perteneciente al grupo de las liasas, que cataliza, a partir de ATP, la síntesis de AMPc. Este actúa como segundo mensajero en múltiples rutas intracelulares, siendo la más estudiada la activación de la PKA.

En la actualidad se han descrito diez isoenzimas diferentes, denominadas tipo 1 a 10, que difieren principalmente en su sensibilidad a los diferentes tipos de subunidades  $G_\alpha$ ,  $G_{\beta\gamma}$  y CaM (New, Tsim et al. 2003).

La mediación de proteína G sensible a toxina pertúsica, y su acción sobre la acumulación de AMPc intracelular, inducida por los receptores de melatonina, fue ya descrita por Carlson et al en 1989 (Carlson, Weaver et al. 1989). La inactivación de esta vía por la toxina pertúsica, indicaba claramente la implicación de la proteína  $G_i$  como mediador en la transducción. En 1995, quedó demostrado el acoplamiento de  $Mel_{1c}$  a proteína  $G_i$ , y la acción directa de la subunidad  $G_{\alpha i}$  sobre la adenilato ciclasa y la consecuente disminución de AMPc (Fig. I.18) (Yung, Tsim et al. 1995).

Sin embargo, esta no es la única vía por la que los receptores de melatonina modulan la acción de la AC. Esto es debido al gran número de isoenzimas diferentes, y a la capacidad de los receptores de melatonina por asociarse a diferentes tipos de proteína G. La subunidad  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha z}$  son capaces de inhibir las AC tipo 1 a 6, mientras que  $G_o$  no ha demostrado inhibir a las AC tipo 2, 4, 5 y 6 (New, Tsim et al. 2003). Las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  son capaces de inhibir la AC tipo 1; sin embargo actúan como activadores de las AC tipo 2,4 y

6, cuando estas han sido preactivadas por  $G_{\alpha s}$  o fosforiladas por PKC (Tsu and Wong 1996). Este fenómeno, se ha constatado en modelo de células embrionarias renales transfectadas con receptor  $Mel_{1c}$  y sobreexpresión de AC tipo 2. En este modelo la melatonina fue capaz de aumentar la acumulación de AMPc intracelular (Yung, Tsim et al. 1995) a través de un receptor de melatonina acoplado a proteína  $G_i$  y  $G_z$ , vía subunidad  $G_{\beta\gamma}$  (Fig. I.18).



### Figura I.18. Vías de señalización. AMP<sub>c</sub>

Esquema gráfico de la regulación de la actividad de la adenilato ciclasa asociada a la melatonina y sus receptores. De forma clásica se considera la proteína  $G_i$  como el principal mediador de esta vía, sin embargo la regulación de AC presenta otros moduladores como la proteína  $G_s$ ,  $G_q$ , subunidades  $\beta\gamma$ , PKC y CaM.

Este modelo podría explicar aparentes contradicciones como la potenciación que produce la melatonina en la acumulación de AMPc inducida por péptido intestinal vasoactivo en leucocitos humanos (Lopez-Gonzalez, Calvo et al. 1992).

De forma independiente a los mecanismos ya mencionados, la CaM es capaz de inhibir la activación de la AC tipo 5 y 6 (Taussig and Gilman 1995). De esta forma, la melatonina por acción directa sobre la CaM, impidiendo la unión del  $Ca^{2+}$  a la calmodulina, sería capaz de desactivar la inhibición sobre estos dos tipos de AC, y por lo tanto aumentar las concentraciones intracelulares de

AMPC. En contraposición, las AC tipo 1,3 y 7 son activadas por la CaM (Taussig and Gilman 1995); por lo que la inhibición de ésta, repercutiría en un descenso en los niveles de AMPC (Fig. I.18).

Otra posible vía de regulación de la AC implica la activación de ésta por fosforilación mediada por PKC. Las AC tipo 1-8 presentan este tipo de regulación (Taussig and Gilman 1995). Como ya se ha discutido anteriormente, los receptores de melatonina pueden activar esta vía de señalización por diferentes mecanismos. La activación de la PKC y la fosforilación de la AC tipo 1 a 8, promovería por lo tanto el aumento en las concentraciones intracelulares de AMPC (Fig. I.18) (New, Tsim et al. 2003).

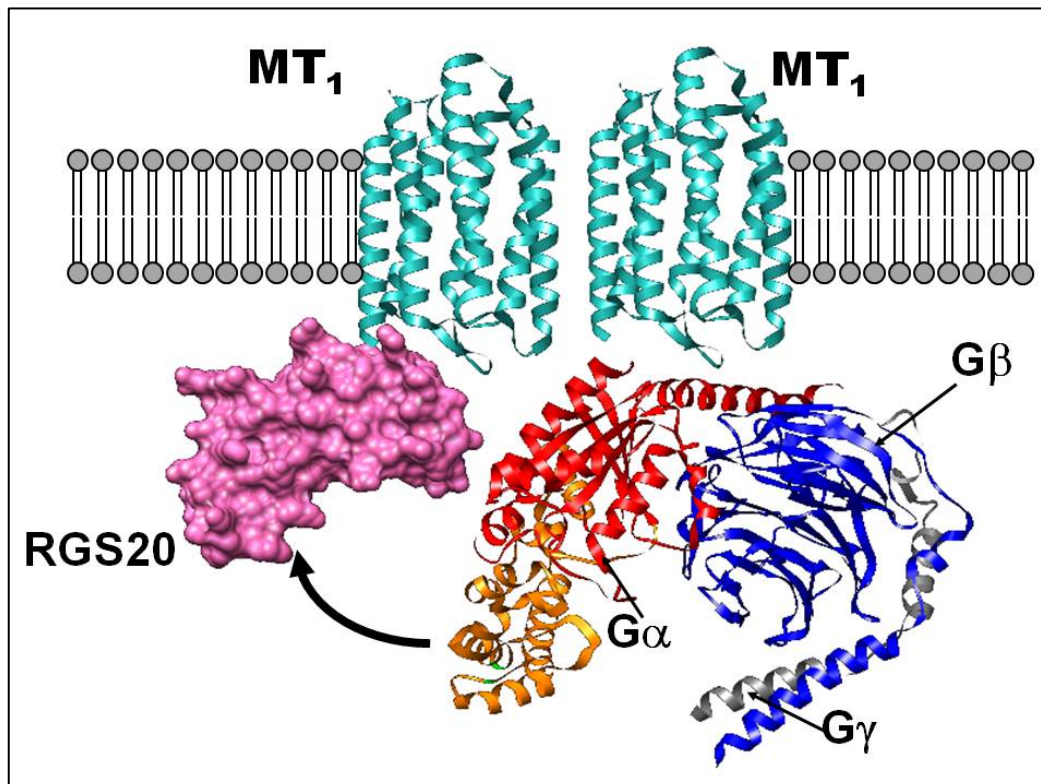
Por lo tanto, la respuesta final desencadena por la melatonina y sus receptores, dependerá de las diferentes combinaciones entre proteínas G, vía de señalización activada y la presencia mayoritaria de las diferentes isoenzimas pertenecientes a esa vía presentes en cada tipo celular.

Esta variedad en la transducción de diferentes señales intracelulares dificulta el estudio de los receptores de melatonina, más si cabe, cuando los mismos receptores además de regular diferentes segundos mensajeros, pueden regular la misma vía de transducción de forma positiva o negativa, atendiendo a las condiciones ambientales o tipo celular estudiado (New, Tsim et al. 2003).

#### 4.3.2.3 Formación de oligómeros

La diversidad en las vías de transducción puede no sólo depender de la variedad existente de asociaciones a proteína G, sino también a las asociaciones de estos receptores en forma de homómeros o heterómeros que pueden modificar esa transducción. La capacidad de oligomerización (tanto homómeros como heterómeros) de estos receptores es bien conocida, y se ha demostrado la formación de estas estructuras en células HEK239T transfectadas con receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> humanos (Ayoub, Couturier et al.

2002), llegando a sugerirse que el receptor  $MT_2$  existe preponderantemente en forma de heterómero  $MT_1/MT_2$  (Ayoub, Levoye et al. 2004).



**Figura I.19. Homodímero de receptores de melatonina  $MT_1$ - $MT_1$ .**

Ejemplo de dimerización de receptores de melatonina. Uno de los receptores  $MT_1$  se encuentra acoplado al regulador de proteína G 20 (RGS20), modificando la señal de proteína G acoplada al receptor  $MT_1$  que completa el homodímero. *Imagen obtenida de [www.cochin.inserm.fr](http://www.cochin.inserm.fr)*

Si bien la existencia de oligómeros en los receptores de la familia GPRCs ha sido descrita profusamente en modelos celulares transfectados, su funcionalidad in vivo ha sido siempre muy cuestionada (Bouvier, Heveker et al. 2007; Lohse 2010; Kamal and Jockers 2011).

A pesar de la polémica suscitada sobre su funcionalidad real, la coexistencia celular de receptores extremadamente similares en afinidad por melatonina y acoplados a la misma vía de transducción, sugiere una interacción entre ambos receptores. En 2013, un trabajo de Baba et al (Baba, Benleulmi-Chaachoua et al. 2013) asoció una función biológica, la regulación de los fotorreceptores de la retina, con la posible formación de heterómeros  $MT_1/MT_2$ ; que implicaría la transducción de la señal a través de la vía PLC/PKC. Sin embargo, la existencia de la oligomerización de estos receptores

como un mecanismo que explique la promiscuidad existente en la transducción a diferentes vías de señalización, está aún lejos de ser demostrado.

Aún más interesantes parece ser la posibilidad de la formación de heterómeros de receptores de melatonina con otras familias de receptores. Estudios recientes ya confirman esta posibilidad, apuntando la existencia de heterómeros  $MT_2/5HTC_{2c}$  (Kamal, Gbahou et al. 2015).

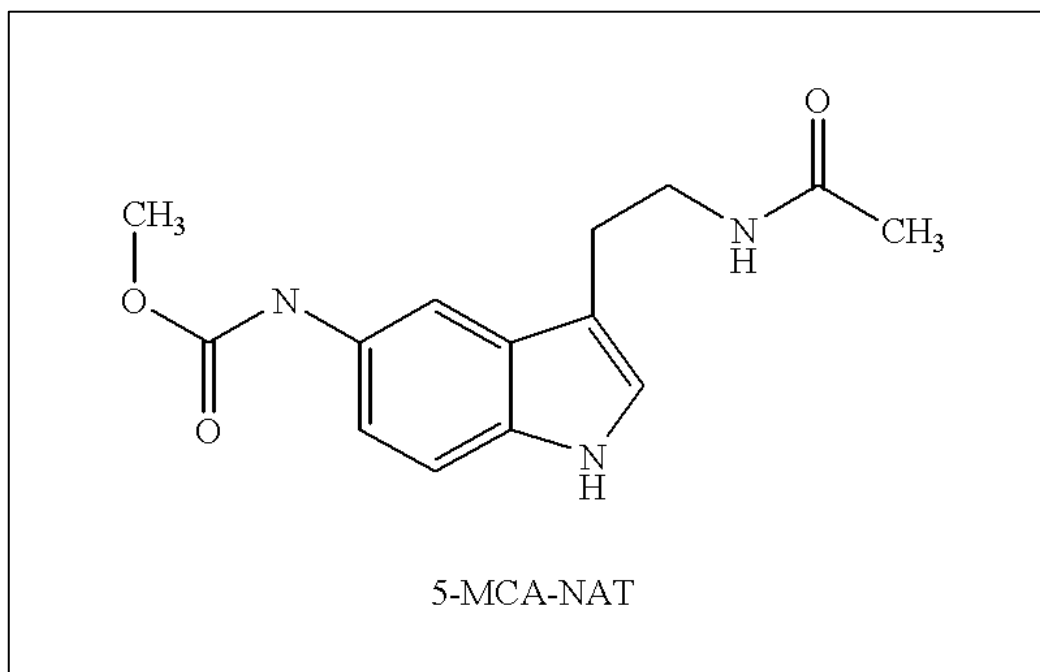
#### 4.4 MELATONINA Y 5-MCA-NAT. IMPLICACIONES EN LA PIO

Como ya se ha mencionado con anterioridad, son muchas las estructuras oculares capaces de sintetizar melatonina, y que ésta se realiza siguiendo un ciclo circadiano. De esta forma podemos afirmar, que la síntesis de melatonina es alta durante la noche, reduciéndose su concentración durante el día [(Lewy, Wehr et al. 1980; Tosini, Davidson et al. 2007)].

Al analizar las variaciones circadianas de la PIO, podemos observar que los valores más altos de PIO se obtienen durante el día, reduciéndose en los periodos nocturnos (Samples, Krause et al. 1988). De esta manera se pueden correlacionar de forma inversa la PIO con la síntesis de melatonina en el ojo.

Si tenemos en cuenta que se ha descrito la presencia de receptores de melatonina en procesos ciliares de diferentes especies (Osborne and Chidlow 1994; Pintor, Martin et al. 2001; Wiechmann and Wirsig-Wiechmann 2001; Pintor, Pelaez et al. 2003), no es difícil asumir en estos receptores una posible función reguladora sobre la PIO.

En estos mismos estudios, la melatonina y los análogos de ésta como, el 5-MCA-NAT, han demostrado ser efectivos en la reducción de la PIO en diferentes modelos animales; incluyendo primates (Serle, Wang et al. 2004) y humanos (Samples, Krause et al. 1988; Ismail and Mowafi 2009).



**Figura I.20. Molécula de 5-MCA-NAT.**

Formula desarrollada del 5-metoxi-carbonilamino-*N*-acetilriptamina . Imagen obtenida de [www.cochin.inserm.fr](http://www.cochin.inserm.fr)

El 5-MCA-NAT (Fig. I20) presenta ciertas particularidades frente a la melatonina u otros derivados de ésta. La disminución de la PIO en modelos in vivo producida por el 5-MCA-NAT, lo sitúa, como agente hipotensor, por encima de la melatonina y otros derivados (Pintor, Martin et al. 2001; Pintor, Pelaez et al. 2003). Otra particularidad en la acción hipotensora del 5-MCA-NAT frente a la melatonina es la falta de desensibilización. Tanto para los receptores  $MT_1$  como  $MT_2$  se ha comprobado fenómenos de desensibilización a dosis continuadas de melatonina (MacKenzie, Melan et al. 2002; Gerdin, Masana et al. 2003). Sin embargo este fenómeno no ocurre con el 5-MCA-NAT. Dosis continuadas de este análogo mantienen los efectos hipotensores, incluso tras administraciones superiores a cuatro días (Pintor, Pelaez et al. 2003).

La acción hipotensora del 5-MCA-NAT, que como ya hemos mencionado es un agonista selectivo del receptor putativo  $MT_3$ , implica directamente a éste en las funciones reguladoras de la PIO mediadas por receptores de melatonina (Pintor, Martin et al. 2001). Sin embargo, en los experimentos de Alarma-Estrany de 2009 (Alarma-Estrany, Crooke et al. 2009), quedó demostrado que

los efectos hipotensores del 5-MCA-NAT se mantenían tras el silenciamiento de NQO2 (identificado como el receptor  $MT_3$ ) (Nosjean, Ferro et al. 2000).

Estos hallazgos ponen en entredicho la identificación formal del receptor  $MT_3$  como la enzima NQO2; atribuyendo las acciones hipotensoras de la melatonina y sus derivados, como el 5-MCA-NAT, a la mediación de receptores  $MT_2$  junto con algún receptor de melatonina no identificado, y clásicamente llamado  $MT_3$  (Alarma-Estrany, Crooke et al. 2009).

Con posterioridad a estos estudios, en un trabajo de Vincent et al (Vincent, Cohen et al. 2010), se cuestionó el papel del 5-MCA-NAT como agonista selectivo de los y receptores  $MT_3$ . En este trabajo el 5-MCA-NAT es definido como un potente agonista parcial de los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$ , atribuyendo las acciones hipotensoras del 5-MCA-NAT a dichos receptores.

En este mismo sentido, (Dortch-Carnes and Tosini 2013), proponen también que los efectos hipotensores de la melatonina y el 5-MCA-NAT, estarían mediados por los receptores clonados de melatonina, en concreto por el receptor  $MT_2$ ; y acoplados a la inhibición del  $GMP_c$  (Dortch-Carnes and Tosini 2013).

De esta manera, las vías de actuación hipotensora de la melatonina y sus derivados parecen quedar circunscritas al mismo receptor de melatonina. Sin embargo, aún quedan por explicar las diferencias encontradas en la respuesta hipotensora sobre la PIO de estos compuestos

Las conclusiones aportadas por el trabajo de Dortch-Carnes y Tosini se sustentan en la acción inhibitoria del antagonista selectivo del receptor  $MT_2$  4-fenil-2-propioamidotetralina (4-P-P-DOT) sobre la acción del 5-MCA-NAT. El efecto de este antagonista sobre la acción hipotensora del 5-MCA-NAT ya fue probada por Pintor et al varios años antes (Pintor, Pelaez et al. 2003), resultando también en una inhibición parcial en modelo *in vivo*. Sin embargo en estos experimentos la utilización de un antagonista selectivo del receptor  $MT_3$ , frente a los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  (prazosín) mostró una inhibición más rápida y acusada de dichos efectos.

Similares estudios realizados por Alarma-Estrany et al en 2011(Alarma-Estrany, Guzman-Aranguez et al. 2011), demostraron la acción selectiva de este antagonista frente a nuevos compuestos hipotensores derivados de melatonina. En este estudio se diferencia la acción del compuesto INS48862 y el INS48852, cuya acción mediarían receptores  $MT_2$ , frente al compuesto INS48848, que actuaría vía  $MT_3$  (Alarma-Estrany, Guzman-Aranguez et al. 2011).

La complejidad de las vías de señalización y las respuestas finales inducidas por los receptores de melatonina hacen difícil elucidar el papel y la acción específica del 5-MCA-NAT. Las dudas suscitadas sobre la especificidad de éste como agonista selectivo, y la identidad del receptor putativo  $MT_3$ , son cuestiones aún pendientes de resolución.



## 11. Hipótesis y Objetivos

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La melatonina y su análogo el 5-MCA-NAT han sido descritos como potentes hipotensores de la presión intraocular en diferentes modelos animales *in vivo* y en humanos. La literatura existente apunta a que estas sustancias regulan la formación del humor acuoso disminuyéndola; sin embargo, los mecanismos responsables de esta regulación permanecen aún sin descifrar.

La secreción de cloruro en el epitelio ciliar ha sido descrita como el paso fundamental y limitante en la formación del humor acuoso, y por lo tanto, aparece como un posible punto de regulación de esta formación. Este hecho convierte a los procesos secretores en una posible diana de sustancias hipotensoras como la melatonina y el 5-MCA-NAT

Los estudios realizados en presión intraocular en diferentes modelos animales muestran diferencias en el comportamiento de algunos análogos como el 5-MCA-NAT frente a la molécula natural, la melatonina. Esto podría implicar la existencia de receptores o mecanismos de acción diferentes para estos compuestos, sin embargo al no conocerse los mecanismos implicados este fenómeno carece actualmente de explicación.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, apuntan la existencia de una acción hipotensora a largo plazo no presente en el caso de la melatonina. Los mecanismos implicados en esta acción son totalmente desconocidos.

Frente a estas cuestiones los objetivos planteados han sido desglosados atendiendo al periodo de acción de estas sustancias:

- Caracterización de la respuesta hipotensora a corto plazo:
  - Estudiar los mecanismos hipotensores de la respuesta aguda a la melatonina y el 5-MCA-NAT, investigando la implicación de la secreción de cloruro

- Estudiar las posibles diferencias en el perfil farmacológico entre ambas sustancias
  - Elucidar la identidad del receptor o receptores implicados en este mecanismo
  - Identificar las vías de transducción implicadas en la acción hipotensora de ambos compuestos
- 
- Caracterizar la respuesta hipotensora a largo plazo:
    - Verificar la acción hipotensora a largo plazo del 5-MCA-NAT
    - Elucidar los mecanismos celulares de esta respuesta
    - Caracterizar la interacción de esta respuesta con los fármacos hipotensores actuales.



### III. Recopilación de artículos

### III. RECOPIACIÓN DE ARTÍCULOS

Con el fin de facilitar la lectura y comprensión de este trabajo, la información ha sido desglosada en función de las acciones de estas sustancias a corto plazo (acción aguda con duraciones estimadas en horas) y efectos a largo plazo (acciones que se prolongan a lo largo de días). A pesar de la diferenciación establecida en este trabajo, que responde únicamente a criterios de legibilidad, ambos efectos se sustentan en última instancia en el mismo proceso fisiológico de disminución en la formación del humor acuoso.

No obstante, a pesar de que en ambas acciones la respuesta efectora final sea equivalente, los mecanismos que desembocan en esta han de ser, forzosamente, diferentes. De esta forma la recopilación de artículos atendiendo a esta división queda dividida como sigue:

- Estudios a corto plazo:
  - *“Melatonin Receptors Trigger cAMP Production and Inhibit Chloride Movements in Nonpigmented Ciliary Epithelial Cells”*
  
- Estudios a largo plazo:
  - *“Involvement of carbonic anhydrases in the ocular hypotensive effect of melatonin analogue 5-MCA-NAT”*
  
  - *“Regulation of ocular adrenoceptor genes expression by 5-MCA-NAT: implications for glaucoma treatment”*
  
  - *“Melatonin and Its Analog 5-Methoxycarbonylamino-NAcetyltryptamine Potentiate Adrenergic Receptor-Mediated Ocular Hypotensive Effects in Rabbits: Significance for Combination Therapy in Glaucoma”*

## **Efectos a corto plazo: Artículo 1**

## **Efectos a largo plazo: Artículo 2**

## **Efectos a largo plazo: Artículo 3**

## **Efectos a largo plazo: Artículo 4**



## IV. Discusión

## **IV. DISCUSIÓN**

El glaucoma agrupa diversas patologías oculares caracterizadas por presentar daño en las células ganglionares de la retina y el nervio óptico (Quigley 2011), sin embargo la etiología desencadenante de esta neuropatía varía en función del tipo de glaucoma.

La Organización Mundial de la Salud, con datos recabados en la década de los 90, estimó que cada año se diagnostican 2.4 millones de nuevos casos de glaucoma, con una prevalencia entre el 1.5% y el 2% y un total de 8 millones de casos de ceguera producidos por esta patología (Alañón and Ferreiro 2003). Se estima que aproximadamente 65 millones de personas sufren esta patología, y que alcanzará los 80 millones de afectados en 2020 (Quigley and Broman 2006). Estos datos sitúan a las patologías glaucomatosas como la segunda causa de ceguera mundial. Los estudios epidemiológicos en nuestro país, arrojan cifras similares en los que la prevalencia se sitúa en el 1.81% (Alañón and Ferreiro 2003).

El tipo de glaucoma más frecuente es el de ángulo abierto, que suma el 60% de los casos. Este tipo de glaucoma se caracteriza por presentar una elevación anormal de la PIO, que desencadena la neuropatía. La elevación de la PIO se traduce en una disminución del aporte sanguíneo hacia la retina, y un aumento en la liberación de glutamato, promoviendo a su vez un aumento en la concentración de radicales libres y el daño neuronal (Moreno, Sande et al. 2005; Rosenstein, Pandi-Perumal et al. 2010; Almasieh, Wilson et al. 2012).

La estrategia terapéutica más común en el tratamiento del glaucoma se basa en la reducción de la PIO mediante el uso de fármacos hipotensores. El arsenal farmacéutico actualmente disponible para el control de la hipertensión es muy amplio, comprendiendo inhibidores de las CAs, análogos de prostaglandinas, beta-bloqueantes, simpatomiméticos y agentes colinérgicos (Webers, Beckers et al. 2008; Lee and Goldberg 2011; Carta, Supuran et al. 2012). Desafortunadamente, el uso de estos fármacos implica en muchos casos la aparición de efectos secundarios indeseables asociados a su

utilización como la visión doble, depresión, náuseas o dificultades respiratorias. Sumada a esta desventaja, en un porcentaje importante de los pacientes, es necesaria la combinación de varios fármacos diferentes para obtener una disminución terapéutica de los niveles de PIO, lo que acentúa aún más los efectos no deseados de la terapia (Crooke, Colligris et al. 2012).

De forma paralela a los inconvenientes terapéuticos ya reseñados, algunos autores postulan la necesidad de complementar la utilización de fármacos hipotensores mediante la administración de neuroprotectores (Cordeiro and Levin 2011; Pascale, Drago et al. 2012). En este nuevo horizonte terapéutico la melatonina y sus derivados podrían suponer una alternativa viable que solvante los inconvenientes asociados al uso de las terapias clásicas (Pintor, Martin et al. 2001; Pintor, Pelaez et al. 2003; Crooke, Colligris et al. 2012).

La evidente ventaja que presenta la melatonina en este marco terapéutico es doble: en primer lugar no se han descrito reacciones adversas evidentes tras su administración a dosis que permitan un efecto hipotensor terapéutico (Ismail and Mowafi 2009), y en segundo lugar, la capacidad de la melatonina y sus derivados metabólicos como antioxidantes les confiere un papel neuroprotector frente al estrés oxidativo (Belforte, Moreno et al. 2010; Leibowitz, Volkov et al. 2015).

En contraposición a estas ventajas encontramos que la administración de melatonina exógena conduce a un proceso de desensibilización asociado a los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  (MacKenzie, Melan et al. 2002; Gerdin, Masana et al. 2003), lo que puede cuestionar su utilización como fármaco. A diferencia de la melatonina, algunos análogos como el 5-MCA-NAT no presentan este fenómeno (Pintor, Martin et al. 2001; Pintor, Pelaez et al. 2003). A este hecho, debemos añadir que el 5-MCA-NAT ha sido descrito como un hipotensor más potente que la propia melatonina (Pintor, Martin et al. 2001; Pintor, Pelaez et al. 2003), y que, como se muestra en la figura 1 B, artículo 2 y en la figura 1 (artículo 3), sus efectos se prolongan en el tiempo, lo que posiciona a esta molécula como un buen candidato a fármaco en el tratamiento de la hipertensión ocular.

Para entender las diferencias encontradas entre el 5-MCA-NAT y la melatonina, es necesario entender cuáles son los mecanismos que desencadenan estas moléculas en la dinámica del humor acuoso.

### **Efectos a corto plazo**

Como ya hemos reseñado anteriormente, en el proceso de formación del HA el paso limitante es la secreción de  $\text{Cl}^-$  hacia cámara posterior (ver introducción 2.1. 3ª etapa), por lo que éste se plantea como un importante punto de regulación (Civan and Macknight 2004).

Nuestros resultados muestran por primera vez (Fig. 1B, artículo 1), como la melatonina y el 5-MCA-NAT son capaces de disminuir la secreción de  $\text{Cl}^-$  en células NPE de epitelio ciliar, sugiriendo este mecanismo como el responsable de los efectos hipotensores de la melatonina y sus análogos.

Analizando más profundamente la modulación que ejerce la melatonina y el 5-MCA-NAT sobre la secreción de  $\text{Cl}^-$  en células NPE no encontramos diferencias significativas en el comportamiento de ambas sustancias, atendiendo a la respuesta secretora a diversas concentraciones (Fig. 2 A y B, artículo 1). No obstante al analizar los datos representados en la tabla 1 (artículo 1) sobre fluorescencia máxima ( $F_{\text{max}}$ ), tiempo para obtener la mitad de la  $F_{\text{max}}$  ( $t_{50}$ ) y la velocidad del proceso de secreción ( $V$ ), únicamente la  $F_{\text{max}}$  muestra diferencias significativas entre ambas sustancias.

Este fenómeno se aprecia más claramente al observar la evolución que siguen las diferentes curvas en la figura 1 (Fig. 1, artículo 1). Los controles mantienen una curva sigmoidea con un crecimiento inicial exponencial que rápidamente pasa a mantener una velocidad constante en la pérdida de  $\text{Cl}^-_i$  (zona intermedia de pendiente constante) y finalmente una asíntota horizontal que se establece cuando las células comienzan el cierre de los canales en respuesta a una pérdida excesiva de  $\text{Cl}^-_i$ . En contraposición a los controles, las células tratadas con melatonina o 5-MCA-NAT siguen también una curva sigmoidea, sin embargo estas no presentan un crecimiento inicial exponencial,

sino que durante 10 y 14 minutos respectivamente no existe secreción de  $Cl^-$ . Tras este intervalo se produce un aumento en la secreción muy similar para ambas sustancias, y que siempre mantiene una pendiente menor que la de los controles.

Las diferencias existentes en el comportamiento de la melatonina y el 5-MCA-NAT comienzan a observarse alrededor de los 60 minutos. La curva del 5-MCA-NAT y la de la melatonina comienzan a diferenciarse. Mientras la melatonina comienza a igualar su pendiente a la del control y la mantiene constante el 5-MCA-NAT disminuye nuevamente la velocidad en la secreción de  $Cl^-$ . Esto implica que la melatonina alcanzará finalmente niveles de  $Cl^-_i$  similares a los del control. Por el contrario la curva del 5-MCA-NAT tiende hacia una asíntota horizontal más baja, es decir una mayor concentración de  $Cl^-_i$  que el control o la melatonina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en modelo *in vivo*, donde la acción hipotensora del 5-MCA-NAT es mayor a la de la melatonina (Pintor, Pelaez et al. 2003).

Como ya vimos en la introducción (introducción 4.3), la mayoría de las acciones realizadas por la melatonina son mediadas por receptores de membrana, por lo que es presumible que la modulación en la secreción de  $Cl^-$  sea mediada por alguno de los receptores de melatonina ya citados. Varios estudios sugieren la implicación directa del receptor  $MT_3$  como mediador de los efectos hipotensores del 5-MCA-NAT (Pintor, Martin et al. 2001; Pintor, Pelaez et al. 2003). En la misma dirección los estudios de Alarma-Estrany (Alarma-Estrany, Crooke et al. 2008) sitúan los receptores  $MT_2$  y  $MT_3$  como mediadores de la respuesta hipotensora a la melatonina y análogos. Esta misma autora, cuestiona además la identificación del receptor  $MT_3$  como la enzima NQO2 (Alarma-Estrany, Crooke et al. 2009) demostrando que los efectos hipotensores del 5-MCA-NAT se mantienen tras el silenciamiento de esta enzima. En un trabajo posterior Vincent (Vincent, Cohen et al. 2010) demuestra la capacidad del 5-MCA-NAT para actuar como un potente agonista parcial de los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$ , atribuyendo la acción hipotensora de este compuesto a una respuesta independiente de la enzima-receptor NQO2- $MT_3$ .

En esta misma línea, Dortch-Carnes y Tosini (Dortch-Carnes and Tosini 2013) demostraron que el 5-MCA-NAT era capaz de modular la formación de  $GMP_c$ , en un proceso mediado por NO e inducido por un receptor  $MT_2$ , sugiriendo este mecanismo como el regulador en la formación del HA.

Todos estos datos, parcialmente contradictorios, parecen enclavar la acción hipotensora de la melatonina y el 5-MCA-NAT al receptor  $MT_2$ , si bien no explican las diferencias en el comportamiento de los diferentes agonistas descritas en la literatura (ver introducción 4.3.2).

Nuestros resultados al utilizar los compuestos 4-P-P-DOT y DH-97, por sus características como antagonistas selectivos del receptor  $MT_2$ , y luzindol como antagonista no selectivo, muestran que ninguna de las sustancias consiguió revertir el efecto de la melatonina ni el 5-MCA-NAT. Este no es el único caso descrito en la literatura, en el que el luzindol no es capaz de revertir los efectos de la melatonina o análogos. Santagostino-Barbone et al, ya describieron esta misma situación en el año 2000 (Santagostino-Barbone, Masoero et al. 2000) desacoplando los efectos de análogos de melatonina de los receptores  $MT_1/MT_2$ ; sin embargo en nuestros resultados la utilización del DH-97 y el luzindol no sólo no revertieron el efecto de la melatonina y el 5-MCA-NAT, sino que los potenciaron (Fig. 3 artículo 1).

Estos datos implican no sólo que la acción de la melatonina y el 5-MCA-NAT sobre la secreción de  $Cl^-$  son mediados por un receptor diferente al  $MT_1/MT_2$  e insensible a luzindol; sino que además su acción es opuesta a éstos.

La aparente contradicción que suscitan nuestros datos con los referidos por Vincent [Vincent et al, 2010] y por Dortch-Carnes y Tosini (Dortch-Carnes and Tosini 2013) quedan resueltos al realizar un estudio más detenido de ambos trabajos. Si bien Vincent (Vincent, Cohen et al. 2010) demuestra que el 5-MCA-NAT es capaz de activar los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$ , sólo sugiere que la acción hipotensora de este compuesto no mediada por NQO2 se realiza a través de estos receptores. En contraposición a esta hipótesis un trabajo posterior de Alarma-Estrany (Alarma-Estrany, Guzman-Aranguez et al. 2011) demuestra la

acción de nuevos análogos de melatonina como hipotensores, algunos de los cuales son insensibles a luzindol y DH-97, pero sensibles a prazosín, demostrando su acción a través de un receptor denominado clásicamente como  $MT_3$ .

Respecto a los datos expuestos en el trabajo de Dortch-Carnes y Tosini (Dortch-Carnes and Tosini 2013), éstos demuestran claramente que el 5-MCA-NAT es capaz de activar los receptores  $MT_2$  acoplados a la modulación del GMPc vía NO, sin embargo a diferencia del trabajo anteriormente mencionado, la identificación de dicho receptor se realiza mediante el uso de 4-P-P-DOT. Este antagonista selectivo del  $MT_2$  ya demostró su capacidad para inhibir la respuesta hipotensora promovida por el 5-MCA-NAT en los experimentos realizados por Pintor (Pintor, Pelaez et al. 2003) (ver introducción 4.4), sin embargo este trabajo demostró un efecto inhibitor mucho más potente asociado a la utilización de prazosín, que ha sido descrito como antagonista específico del receptor  $MT_3$ . Por otro lado, a pesar de demostrar la acción moduladora del 5-MCA-NAT sobre la producción de GMPc vía NO, los autores únicamente proponen este mecanismo como una posible vía de regulación en la secreción de HA, por lo que la aparente contradicción queda resuelta.

Ya que nuestros resultados descartan la implicación del receptor  $MT_2$  como modulador de la inhibición en la secreción de  $Cl^-$ , estudiamos la implicación del receptor putativo  $MT_3$  mediante el uso de un antagonista selectivo de dicho receptor, el prazosín.

Debido a las propiedades fisicoquímicas del prazosín, éste, interfiere con la técnica espectrofluorimétrica empleada para la medición del  $Cl^-$  mediante sonda MQAE. Por este motivo fue necesario el ajuste de la dosis de este compuesto para impedir la aparición de artefactos en los resultados. Los resultados demostraron una reversión parcial del efecto del 5-MCA-NAT y la melatonina al utilizar prazosín a una concentración 1.5  $\mu$ M, sin embargo, de forma sorprendente a concentraciones menores el prazosín potenció la acción del 5-MCA-NAT y de la melatonina (Fig. 4 A y B, artículo 1).

El prazosín además de haber sido descrito como antagonista selectivo del receptor  $MT_3$  frente a los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  (Dubocovich 1995), es bien conocido por sus propiedades como antagonista selectivo de los adrenoreceptores  $\alpha_1$  frente a los  $\alpha_2$  a concentraciones inferiores a las de su acción sobre el receptor  $MT_3$ . Para comprobar si el efecto de potenciación sobre la inhibición en la secreción de  $Cl^-$  a estas concentraciones era debido a su acción sobre los receptores  $\alpha_1$  se utilizó un antagonista selectivo  $\alpha_1$ , la corinantina. El uso de corinantina mimetizó el efecto obtenido con el prazosín a bajas concentraciones, potenciando el efecto del 5-MCA-NAT y confirmando la acción de los adrenoreceptores  $\alpha_1$  en la modulación de la secreción de  $Cl^-$ . (Fig. 5 A y B, artículo 1). De esta forma, nuestros resultados demuestran que la modulación en la secreción de  $Cl^-$  son debidos a un receptor sensible a prazosín denominado clásicamente  $MT_3$ .

Si bien para los receptores clonados de melatonina existe una vía de señalización intracelular canónica, esta no ha sido establecida para el receptor  $MT_3$ . Diferentes artículos señalan a la PLC/PKC como vía de transducción de señales acoplada a estos receptores (Eison and Mullins 1993; Mullins and Eison 1994; Nosjean, Nicolas et al. 2001). Nuestros datos muestran sin embargo que el uso de inhibidores de PLC y PKC no tienen ningún efecto sobre la acción de la melatonina y el 5-MCA-NAT en la secreción de  $Cl^-$  (Fig. 6, artículo 1); por lo que descartamos esta vía de transducción como la responsable de los efectos encontrados.

Dada la complejidad de las vías de señalización atribuidas a estos receptores y la controversia suscitada por la identidad del receptor  $MT_3$ , decidimos ensayar la vía clásica asociada a los receptores de melatonina clonados, asumiendo que nuestro receptor también presenta una estructura GPCR. Los resultados muestran que no sólo no se inhiben los niveles de  $AMP_c$  intracelular como sucede en los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$ , sino que estos aumentan de forma significativa en respuesta a la melatonina y el 5-MCA-NAT. Además, el aumento de  $AMP_c$  intracelular mantiene una relación de dosis-dependencia con la concentración de estos agonistas (Fig. 7 B, artículo 1), que es muy parecida en ambos compuestos, pero más potente para el 5-MCA-NAT. Así mismo, este aumento es mediado por un receptor de melatonina sensible a

prazosín (Fig. 8, artículo 1). Es interesante el hecho de que estos no son los primeros resultados que asocian un aumento del AMP<sub>c</sub> al 5-MCA-NAT. En 2009 un estudio de Sampaio (Sampaio Lde 2009) demostró un efecto similar en retina de pollo asociado a un receptor de melatonina.

Para comprobar si la respuesta secretora de nuestras células a la melatonina y el 5-MCA-NAT es mediada por aumentos intracelulares en los niveles de AMP<sub>c</sub>, se probó la capacidad de la forskolina (activador de la AC) como inhibidor de la secreción de Cl<sup>-</sup>. Los resultados muestran como la forskolina es capaz de reducir la secreción de Cl<sup>-</sup> en nuestro modelo celular (Fig. 7 A, artículo 1) sugiriendo que esta vía de señalización es la responsable de los efectos de la melatonina y el 5-MCA-NAT. Estos resultados coinciden con otros ya publicados donde el aumento de AMP<sub>c</sub> o el uso de forskolina reducen la PIO a través de una reducción en la producción de HA (Caprioli and Sears 1983; Horio, Sears et al. 1996; Do, Kong et al. 2004).

Los resultados aquí expuestos sugieren que los efectos hipotensores a corto plazo promovidos por la melatonina y el 5-MCA-NAT sobre la PIO son causados por la capacidad de estos compuestos de reducir la secreción de Cl<sup>-</sup> hacia cámara posterior en las células NPE de los procesos ciliares. Esta acción es mediada, al menos en parte, por un receptor sensible a prazosín denominado de forma clásica *MT*<sub>3</sub>, y acoplado a un sistema de estimulación de la síntesis de AMP<sub>c</sub>. A este aumento en las concentraciones intracelulares de AMP<sub>c</sub> se opondrían los receptores *MT*<sub>2</sub>, presentes también en este tipo celular, y de forma clásica unidos a proteína G<sub>i</sub>, que serían estimulados por las mismas sustancias. De esta forma, al antagonizar los receptores *MT*<sub>2</sub> se produce una potenciación de la acción hipotensora de estos compuestos, como se ha descrito anteriormente.

### **Efectos a largo plazo**

Una de las ventajas más relevantes del uso del 5-MCA-NAT como hipotensor frente a la melatonina es su prolongado tiempo de acción. Trabajos

realizados previamente en nuestro laboratorio en modelo *in vivo* sugerían esta nueva acción del 5-MCA-NAT sobre la PIO no presente en el caso de la melatonina. Los resultados expuestos en este trabajo muestran por primera vez un efecto hipotensor a largo plazo de un análogo de melatonina, que difiere de los constatados para la molécula principal (Fig. 1 B, artículo 2 y Fig. 1, artículo 3).

Este efecto prolongado en la acción hipotensora del 5-MCA-NAT es perceptible durante más de 5 días, y estadísticamente significativo durante al menos 3 días en nuestro modelo animal, sin embargo los mecanismos implicados en esta acción no han sido aún elucidados. Este tipo de acciones, donde los efectos se dilatan a lo largo de un periodo amplio de tiempo, suelen estar fundamentados en cambios en la expresión de una o varias proteínas implicadas en el mecanismo de acción o de regulación del proceso. La acción de la melatonina como regulador de la expresión génica ha sido constatada por diferentes autores (Mayo, Sainz et al. 2002; Anisimov and Popovic 2004), por lo que éste puede ser el mecanismo responsable de los efectos a largo plazo.

Como se ha expuesto a lo largo de la introducción de este trabajo son muchos los mecanismos implicados en la regulación de la dinámica del humor acuoso y por lo tanto potenciales dianas del 5-MCA-NAT en su acción a largo plazo. En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio observamos fenómenos en los que se daba una inesperada potenciación de los efectos hipotensores del *Trusop*<sup>®</sup>, en conejos que previamente habían sido utilizados en estudios con 5-MCA-NAT, por lo que parece lógico suponer una relación entre los efectos antes referidos del 5-MCA-NAT y la diana de este fármaco.

El *Trusop*<sup>®</sup> (Dorzolamida HCl) es un fármaco comercializado para el tratamiento de la hipertensión ocular y el glaucoma, cuya diana son las CAs. Como ya hemos visto en la introducción (introducción 2.1.1b y 2.1 3ª Etapa) las CAs tienen un papel destacado en la formación del HA. Teniendo presente este hecho y la acción a largo plazo mostrada por el 5-MCA-NAT estudiamos el papel de las CAs como posible diana de esta molécula.

Los resultados obtenidos (Fig. 2 A, artículo 2) en modelo *in vivo* en conejos pretratados con un única dosis de 5-MCA-NAT, confirman el efecto potenciador a largo plazo de esta molécula en la acción hipotensora producida por el *Trusop*<sup>®</sup>. Lo más interesante de esta gráfica no es sin embargo esta potenciación, sino que la misma no responde al sumatorio de los efectos hipotensores de ambas sustancias, lo que indica que el efecto no es la adición de dos efectos independientes, sino interconectados.

La confirmación de esta interconexión se realizó cuantificando los niveles de CA II y CA XII mediante inmunotinción de los procesos ciliares de conejos a las 24 horas del pretratamiento con 5-MCA-NAT. Como podemos ver en la figura 2B (artículo 2) el tratamiento con una única dosis de 5-MCA-NAT promueve una importante reducción de los niveles de ambas enzimas en procesos ciliares, propiciando que la acción del *Trusop*<sup>®</sup> como inhibidor de las CAs sea más potente. Este fenómeno es equiparable a un aumento en la concentración de *Trusop*<sup>®</sup>, ya que al disminuir los niveles de CAs, a igual concentración de este inhibidor, se obtiene más fácilmente un punto cercano a la saturación para éste compuesto.

Como ya vimos anteriormente en la introducción, las CAs se encuentran tanto en células del EP como del ENP. Aunque el mecanismo de acción de las CAs no ha sido por completo elucidado, algunos autores postulan que las CAs de NPE tienen un papel más relevante que las presentes en el PE en el transporte iónico (Murakami, Sears et al. 1992). Por este motivo decidimos comprobar la regulación de estas enzimas en modelo *in vitro* reduciendo su estudio al ENP. En este sentido, la literatura existente recoge ejemplos de la acción de la melatonina sobre la expresión de diferentes genes, y también de la actividad de diferentes enzimas, como las CAs, en otros tipos celulares y tejidos (Beydemir and Gulcin 2004; Esparza, Gomez et al. 2005), por lo que este tipo de regulación podría intervenir en los efectos observados en nuestro modelo. Con este fin se estudió la regulación de los genes que codifican para CA II y CA XII, por su papel en la dinámica del HA y el glaucoma, y la posible influencia del 5-MCA-NAT y de la melatonina, como molécula natural, sobre este sistema. Los resultados obtenidos muestran una importante reducción en los niveles de mensajero para ambas isoenzimas a las 24 horas del tratamiento

con melatonina o 5-MCA-NAT, coincidiendo con los datos obtenidos mediante inmunotinción en el modelo *in vivo*. Sin embargo a las 48 horas sólo la CA12 presenta una disminución estadísticamente significativa, existiendo además una sustancial disminución en el caso del pretratamiento con 5-MCA-NAT (reducción de 6 veces) frente al obtenido mediante el pretratamiento con melatonina (reducción de 2 veces) (Fig. 4 A y B, artículo 2). Estos resultados podrían estar identificando la CA XII, enzima sobreexpresada en pacientes glaucomatosos (Liao, Ivanov et al. 2003), como la responsable, al menos parcialmente, de los efectos a largo plazo identificados en la respuesta hipotensora mediada por 5-MCA-NAT y ausentes en el caso de la melatonina.

Sin embargo, la existencia de cambios en los niveles de mensajero no tienen por qué necesariamente traducirse en una variación de los niveles de proteína. En nuestro caso pudimos comprobar mediante técnicas inmunocitoquímicas que en efecto si se produce una reducción ostensible de los niveles de estas isoenzimas, sin embargo la correlación con los estudios de expresión génica no es totalmente certero. Podemos comprobar en la figura 5 (artículo 2), la reducción en los niveles de proteína es similar para ambas sustancias y en ambas isoenzimas, en clara contraposición a los resultados obtenidos a los mismos tiempos en el estudio de expresión génica. Esta discrepancia es fácilmente comprensible al tener en cuenta el retraso siempre existente entre los cambios en los niveles de mensajero y el reciclado de la proteína existente, arrojando datos más parecidos a los obtenidos en el estudio molecular a las 24 horas.

Las diferencias encontradas en la acción del 5-MCA-NAT y la melatonina en su efecto a largo plazo (Fig. 1 B artículo, 2 y Fig. 1, artículo 3) y en la regulación génica de las CAs (Fig. 4 A y B, artículo 2) sugiere que si bien el mecanismo de acción para ambos compuestos es parecido éstos no se corresponden de una forma exacta. Esta situación es fácilmente comprensible si se asume la existencia de varios tipos de receptores que difieren en la afinidad por sus diferentes agonistas y se tiene en cuenta la promiscuidad en las vías de señalización utilizadas por estos receptores (Brydon, Roka et al. 1999; Petit, Lacroix et al. 1999) y explicada previamente en la introducción (introducción 4.3.2.2).

En cualquier caso los resultados aquí expuestos demuestran una acción potenciadora a largo plazo de los efectos de un inhibidor de las CAs mediados por el 5-MCA-NAT y utilizado frecuentemente en el control de la hipertensión ocular y el glaucoma. Esta potenciación se fundamenta en la acción de esta molécula sobre los niveles de expresión de CA II y CA XII propiciados en última instancia por la regulación negativa sobre los niveles de mensajero de estas isoenzimas. A diferencia de la melatonina, el 5-MCA-NAT consigue una disminución prolongada y extremadamente significativa de los niveles de CA 12, lo que sugiere que la regulación de esta isoenzima es, al menos en parte, responsable de los efectos a largo plazo demostrados para el 5-MCA-NAT, en contraposición a la melatonina.

Si bien la implicación de la CA XII en los efectos a largo plazo es clara, ésta no descarta la existencia de otros mecanismos de regulación génica que puedan estar implicados en los efectos del 5-MCA-NAT. Un trabajo publicado en 2007 por Alarma-Estrany et al (Alarma-Estrany, Crooke et al. 2007) demostró la capital importancia del sistema simpático en la acción del 5-MCA-NAT. En estos experimentos, mediante simpatectomía química, los autores consiguen una inhibición significativa de la acción del 5-MCA-NAT, demostrando la existencia de una relación directa entre los efectos hipotensores del 5-MCA-NAT y el sistema simpático.

Tal y como se resume en la introducción (introducción 3.1.1.), los principales responsables identificados en la regulación de la producción del HA son los adrenoreceptores  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  (McLaren 2009), lo que los convierte en candidatos ideales para mediar la acción a largo plazo del 5-MCA-NAT.

Los resultados preliminares muestran claramente cambios significativos en los niveles de expresión en los genes que codifican para los receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  (ADRA2A) y  $\beta_2$  (ADRB2) en células inmortalizadas NPE al ser tratadas con 5-MCA-NAT. Los datos expuestos en la figura 2 artículo 3, muestran una disminución significativa en los niveles de ARNm para ADRB2 constatable tras 24 horas de la adición del agonista, y que se prolonga durante al menos 72 horas. De igual forma se puede constatar un aumento en los niveles de ARNm para ADRA2A tras 24 horas de su estimulación con 5-MCA-

NAT, alcanzando este aumento significación estadística a las 48 horas y manteniéndose éste durante al menos 72 horas.

Con el fin caracterizar mejor esta respuesta realizamos diferentes experimentos en modelo *in vivo* e *in vitro* comparando la respuesta y las posibles diferencias entre ambos agonistas. *In vitro*, tanto el 5-MCA-NAT como la melatonina varían de forma muy parecida los niveles de ARNm para los ADRA2A (Fig. 1 A, artículo 4), donde se aprecia un aumento significativo de estos niveles a las 48 horas del tratamiento para el 5-MCA-NAT, y a las 72 horas del tratamiento en el caso de la melatonina. Dado que los valores obtenidos para ambas sustancias a las 48 horas son muy similares, la diferencia en la significación estadística carece de valor real.

Por otro lado, al analizar los niveles de este receptor mediante inmunofluorescencia a las 72 horas se pudo constatar que los aumentos en los niveles de ARNm se tradujeron en aumentos significativos de la proteína también muy similares para ambas sustancias (Fig. 1 A y B, artículo 4). Estos datos, si bien demuestran una regulación génica de estos receptores por parte de la melatonina y el 5-MCA-NAT, posibilitando una respuesta a largo plazo, no explica las diferencias encontradas a largo plazo entre ambas sustancias. En el mismo sentido, la respuesta inducida en estos receptores parece ser demasiado lenta en el modelo *in vitro* para explicar el efecto a largo plazo observado en modelo *in vivo* a las 24 horas (Fig. 1, artículo 3 y Fig. 1 B, artículo 1)

A diferencia de los receptores ADRA2A en los ADRB2 los niveles de expresión de ARNm disminuyen de una forma significativa a las 24 horas de la adición de los agonistas. Además, existen diferencias significativas entre el 5-MCA-NAT y la melatonina, siendo ésta la que produce una disminución más acusada en los niveles de ARNm (Fig. 2, artículo 4). Los datos obtenidos de las pruebas inmunocitoquímicas demostraron que esta disminución en los niveles de mensajero se traducen también en una disminución en los niveles de proteína, pero curiosamente no hay diferencias significativas en los niveles de expresión de proteína entre ambos compuestos, ni el cambio en estos niveles es equiparable al obtenido a nivel de los mensajeros. Esta misma situación ha

sido ya descrita por otros autores en la regulación de los adrenoreceptores  $\alpha_{1B}$ , donde cambios significativos a nivel de mensajero no se correlacionan con cambios similares de proteína (Coon, McCune et al. 1997). Este hecho puede deberse a una vida media alta de estos receptores debido a una baja tasa de reciclado, que contrarrestaría la disminución en los niveles del mensajero, o a un aumento de actividad de la maquinaria de traducción.

Estos datos muestran que los efectos a largo plazo podría seguir un esquema en dos fases, una inicial durante la primeras 24 horas mediada por la disminución de los receptores ADRB2, y una segunda fase en la que se sumaría un aumento en la expresión de los receptores ADRA2A.

Para comprobar la funcionalidad real de los cambios observados en los niveles de expresión de estos receptores se realizaron diferentes experimentos *in vivo* en los que se estudiaba la acción de la brimonidina (agonista de los ADRA2) y timolol (antagonista de los ADRB2) sobre la PIO al instilarse en ojos pretratados con una única dosis de melatonina o 5-MCA-NAT. Los datos recogidos en la figura 4 (artículo 4) muestran un aumento en la acción hipotensora del timolol al menos en las primeras 24 horas tras la instilación de nuestros agonistas. Este aumento es el esperado en una situación en la que la disminución en los niveles de ADRB2 permite que su antagonista, en este caso timolol, a una concentración no saturada bloquee proporcionalmente más receptores, mimetizando una situación en la que se aumentaría la concentración del antagonista.

La relevancia de estos datos reside en la importancia que tienen los antagonistas de los ADRB como fármacos antiglaucomatosos y en el desarrollo de nuevas sustancias que antagonicen estos receptores (Crider and Sharif 2002).

Más interesantes aún son los resultados al combinar melatonina y 5-MCA-NAT con un agonista de los receptores  $\alpha$  como la brimonidina (Fig. 3 A y B, artículo 4). En este caso, la potenciación de los efectos hipotensores de la brimonidina es extremadamente significativa al menos durante 72 horas tanto para el pretratamiento con melatonina como con 5-MCA-NAT. Los efectos de

potenciación aquí observados se explican fácilmente por los aumentos en los niveles de receptor hallados *in vitro* (Fig. 1, artículo 4). Al aumentar el número de receptores que pueden ser estimulados por el agonista (brimonidina) obtenemos una amplificación final de la señal hipotensora.

Otra cuestión interesante surge al comparar la similitud existente entre estas figuras (Fig. 3A y B, artículo 4) y la figura antes mencionada, figura 1 (artículo 3), o la figura 1 B (artículo 1), que representa el efecto a largo plazo del 5-MCA-NAT. Sin embargo, aunque posiblemente implicadas en la acción a largo plazo del 5-MCA-NAT, estos resultados no explican las diferencias en el funcionamiento del 5-MCA-NAT y la melatonina.

Otro hecho importante es la correlación existente en el modelo *in vitro* y los resultados de PIO obtenidos en modelo *in vivo*. A pesar de que nuestras sustancias promueven una disminución muy sustancial en los niveles de mensajero de los ADRB2 (Fig. 2 A, artículo 4), convirtiéndolos *a priori* en candidatos ideales como hipotensores, estos cambios no se correlación en cambios en los niveles de proteína (Fig. 2A y B, artículo 4), fenómeno que ya ha sido descrito para otros receptores (Coon, McCune et al. 1997). Esta falta de correlación se ve refrendada en los experimentos *in vivo*, donde aunque existe una potenciación del efecto hipotensor, ésta es menos acusada y duradera que la obtenida para los ADRA2A. En éstos, a pesar de que los cambios en los niveles de mensajero son mucho menores (Fig. 1 A, artículo 4), parece existir una mejor correlación con los niveles de proteína lo que se traduce en una potenciación del efecto hipotensor ostensiblemente mayor como podemos ver en la figura 3 A y B (artículo 4). Estos resultados podrían estar indicando que pequeñas variaciones en los niveles de expresión de los receptores ADRA2A pueden propiciar grandes cambios en el modelo *in vivo*, de una complejidad mucho mayor.

Esta complejidad se pone de manifiesto al analizar la acción del 5-MCA-NAT y la melatonina sobre los niveles de mensajero en modelo *in vivo* (Fig. 5 A y B, artículo 4) en los estadios iniciales de su acción. La pobre respuesta mostrada en la potenciación del efecto hipotensor del timolol a través de los receptores ADRB2 (Fig. 4 A y B, artículo 4) se ve refrendada por los datos representados

en la figura 5 B (artículo 4), donde aunque existe una disminución en los niveles de expresión del mensajero para este receptor *in vivo*, ésta es de carácter modesto y únicamente significativa en el caso de la melatonina.

De igual forma, los estudios *in vivo* para los receptores ADRA2A muestran un aumento en los niveles de mensajero de este receptor (Fig. 5 A, artículo 4) que coinciden con la potenciación del efecto hipotensor de la brimonidina (Fig. 3 A y B, artículo 4). Sin embargo, existen grandes diferencias entre los datos obtenidos *in vitro* y éstos. La diferencia más notable es la disparidad entre los efectos obtenidos mediante la instilación de la melatonina frente a los obtenidos en el caso del 5-MCA-NAT. Mientras éste consigue un aumento extremadamente significativo en los niveles de mensajero para el ADRA2A, el aumento producido por la melatonina no alcanza siquiera significación estadística. Esto puede deberse a múltiples causas motivadas en última instancia por la complejidad del modelo *in vivo*. Quizás la más importante esté relacionada con los procesos de desensibilización ya mencionados para la melatonina (MacKenzie, Melan et al. 2002; Gerdin, Masana et al. 2003) y que no afectan al 5-MCA-NAT (Pintor, Pelaez et al. 2003). Teniendo en cuenta este hecho, la desensibilización no afectaría a las células de nuestro modelo *in vitro* ni a las tratadas con 5-MCA-NAT, sin embargo en modelo *in vivo* la melatonina inherente a los ciclos circadianos provocaría una desensibilización parcial que se traduciría en la discrepancia observada entre ambos modelos.

La presencia de melatonina en ciclos circadianos podría también explicar la discrepancia en los tiempos en los que la melatonina y el 5-MCA-NAT promueven el aumento en los niveles de mensajero para el ADRA2A en modelo *in vivo* e *in vitro*. De esta forma, *in vivo* la melatonina producida durante el ciclo de oscuridad estaría aumentando continuamente los niveles de mensajero para este receptor, en contraposición, la desensibilización ya mencionada actuaría regulando negativamente este mecanismo, por lo que una nueva dosis de melatonina exógena apenas aumentaría los niveles de mensajero de ADRA2A. Sin embargo, tras la adición del 5-MCA-NAT, para el cual no se han constatado procesos de desensibilización (Pintor, Pelaez et al. 2003), se produciría la estimulación de un sistema ya preestimulado, elevando los niveles del mensajero a valores parecidos a los mostrados *in vitro* a las 72

horas. Quizás este mecanismo de desensibilización sea el responsable en última instancia de la ausencia de efectos a largo plazo de la melatonina; lo que podría implicar según los resultados de la figura 5 (artículo 4) a los ADRA2A como potenciales mediadores de la respuesta a largo plazo inducida por el 5-MCA-NAT.

En cualquier caso, y a pesar de la complejidad inherente al modelo *in vivo*, podemos afirmar que los datos aportados en estas publicaciones demuestran el papel de la melatonina y la capacidad de ésta y su análogo el 5-MCA-NAT, en la regulación de la expresión de los receptores ADRA2A y ADRB2 y de las isoformas CA II y CA XII en células del epitelio no pigmentado. Como era de esperar, la existencia de múltiples puntos de regulación de procesos tan complejos como la regulación génica de estos receptores e isoenzimas o de la propia dinámica de la PIO dificultan la extrapolación de conclusiones certeras al modelo *in vivo*.

A pesar de este hecho, la importancia de los resultados aquí expuestos se fundamenta en la capacidad de estas moléculas de potenciar a largo plazo la acción de otros fármacos hipotensores en un modelo *in vivo* y mediante la utilización de una única dosis (Fig. 2 A, artículo 2 y Fig. 3 y 4, artículo 4). Teniendo en cuenta que en la mayor parte de los tratamientos actuales es necesaria la administración en gotas de uno o varios fármacos antiglaucomatosos al menos una vez al día (Yeh, Kravitz et al. 2008), las ventajas de una sustancia hipotensora con efectos a largo plazo se hacen patentes. Este hecho abre las puertas a la posible incorporación al arsenal farmacéutico contra la hipertensión ocular de nuevas sustancias que actúen como potenciadores de fármacos ya existentes, haciendo necesarias dosis más reducidas de estos fármacos o eliminando la necesidad de la combinación de varios fármacos, y reduciendo por lo tanto los efectos no deseados.

A estas ventajas farmacológicas debemos añadir la propia acción hipotensora aguda de estas moléculas sobre la PIO (Fig. 1 A, artículo 2), y la implicación de estas en el metabolismo antioxidante.



## Discusión: Figuras

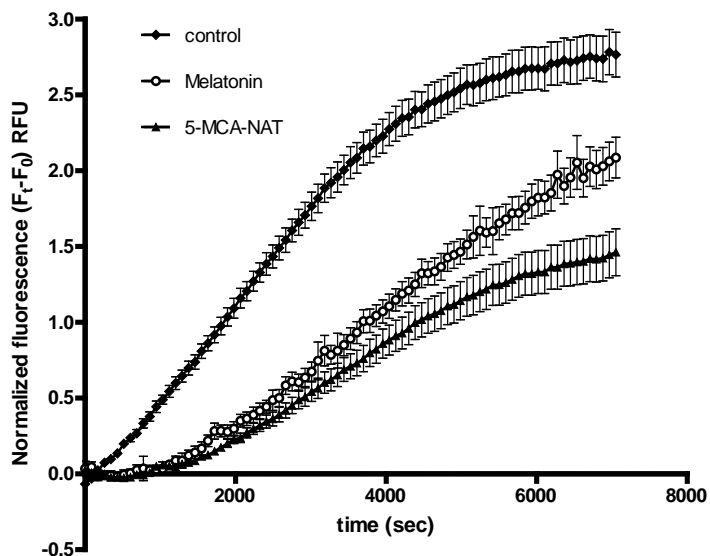


Figura 1 B, artículo 1

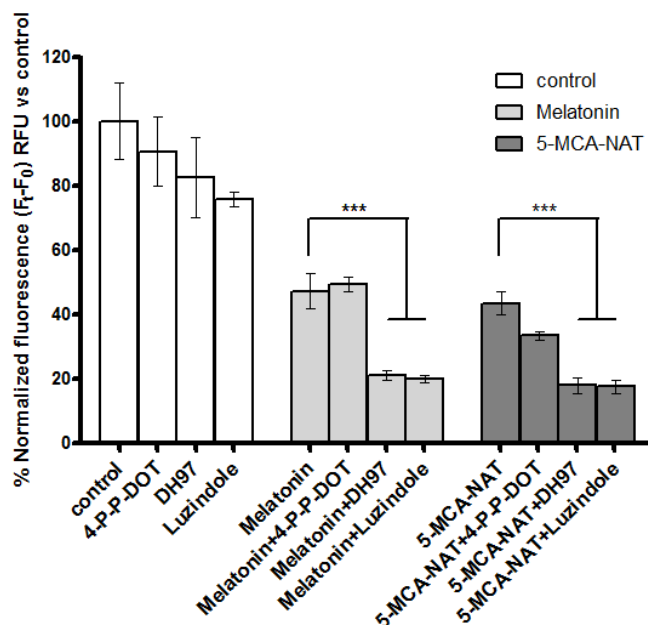


Figura 3, artículo 1

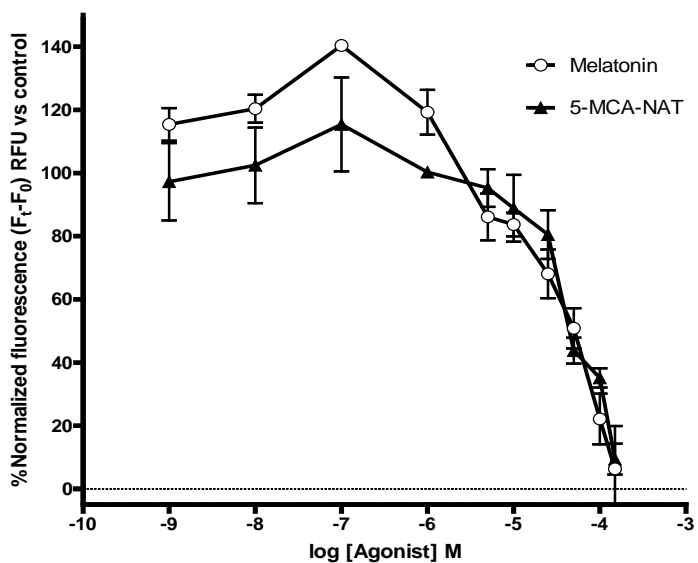


Figura 2 A, artículo 1

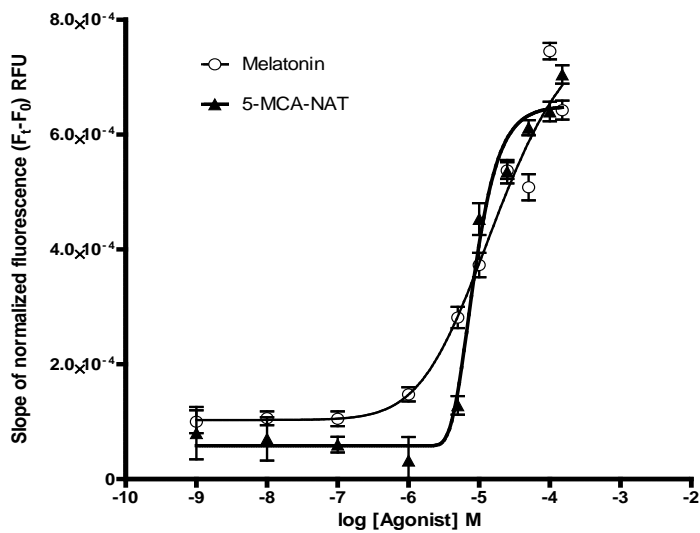


Figura 2 B, artículo 1

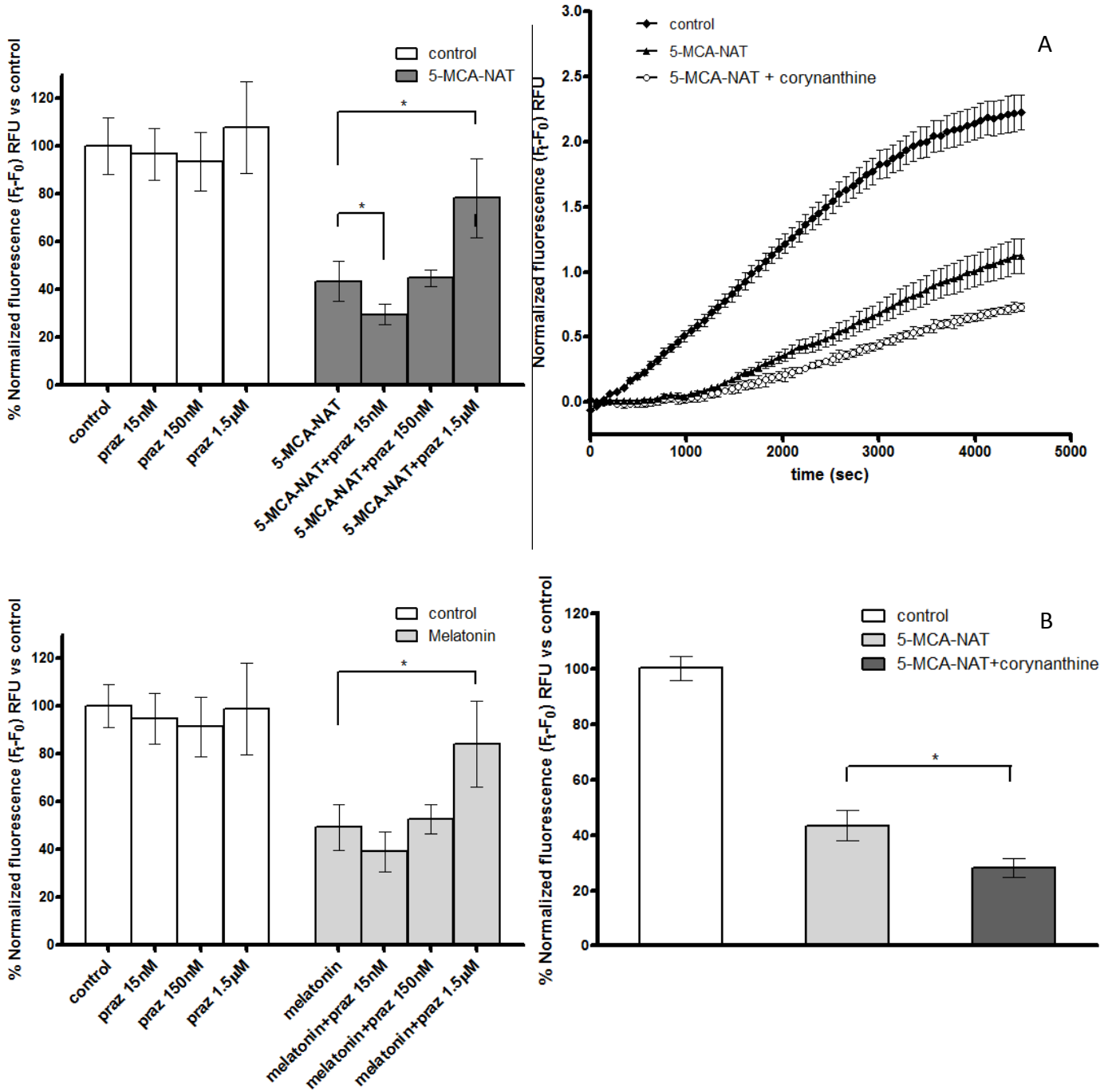


Figura 4, artículo 1

Figura 5, artículo 1

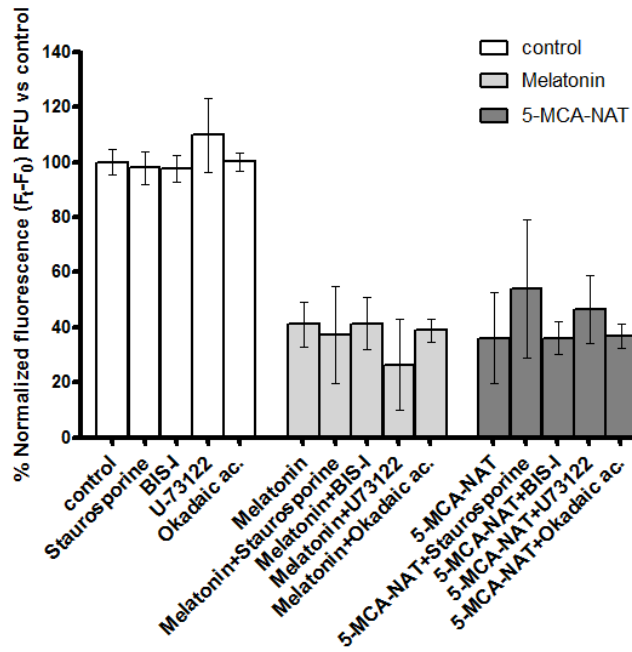


Figura 6, artículo 1

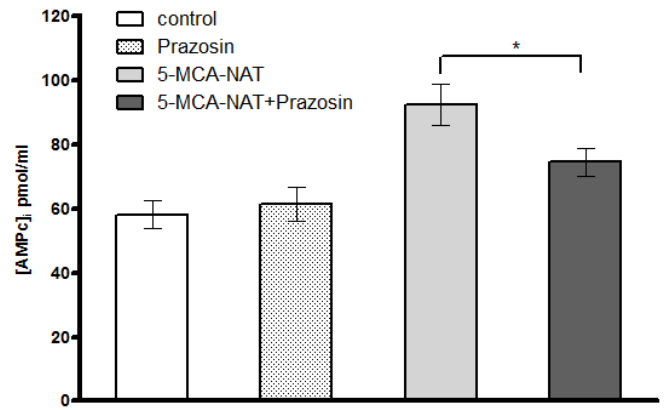


Figura 8, artículo 1

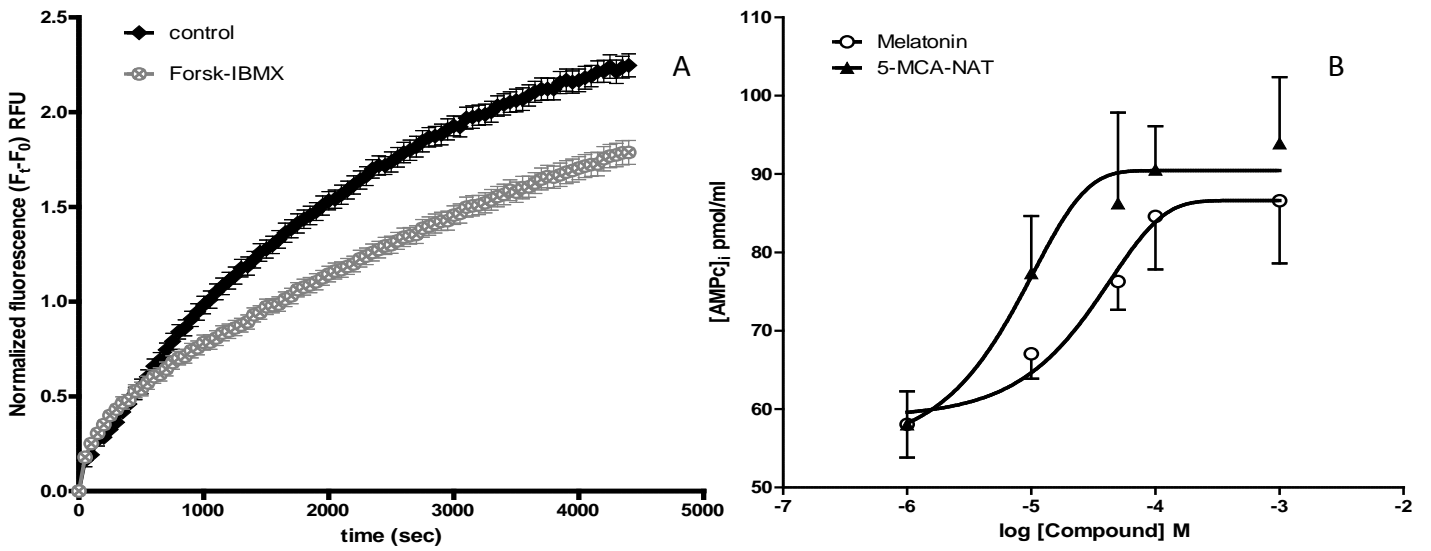


Figura 7, artículo 1

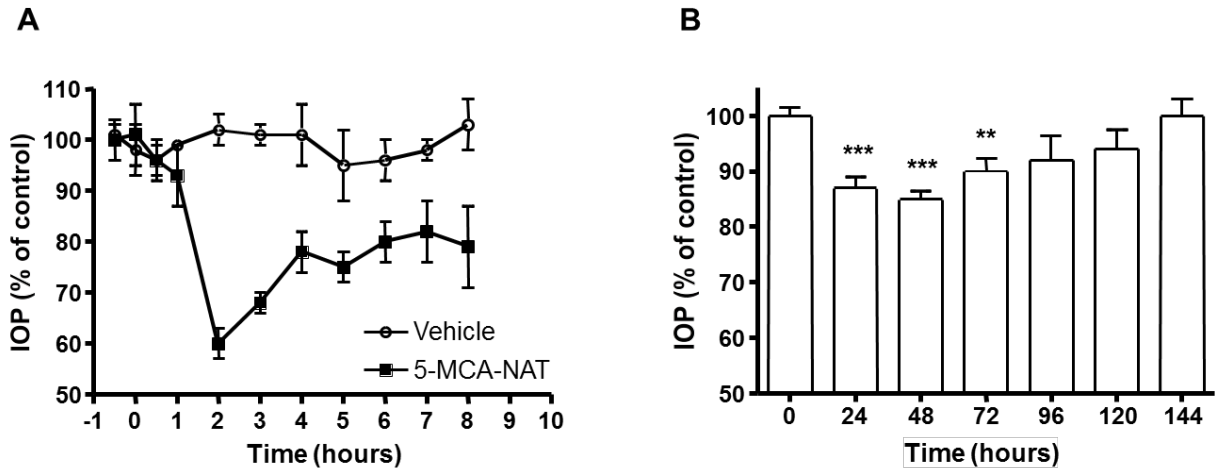


Figura 1, artículo 2

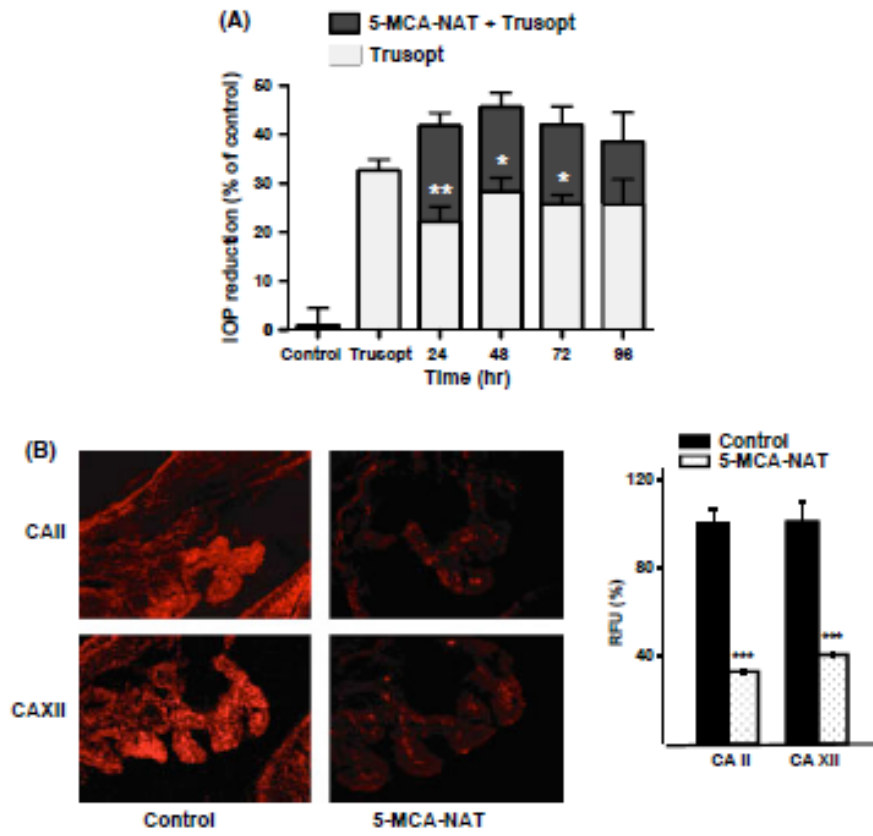


Figura 2, artículo 2

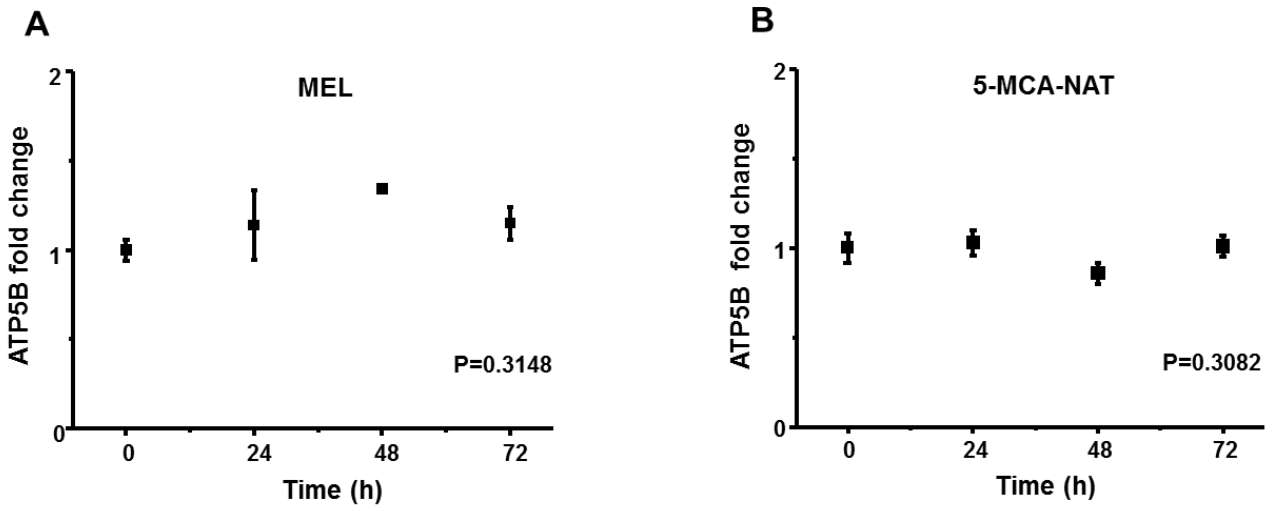


Figura 3, artículo 3

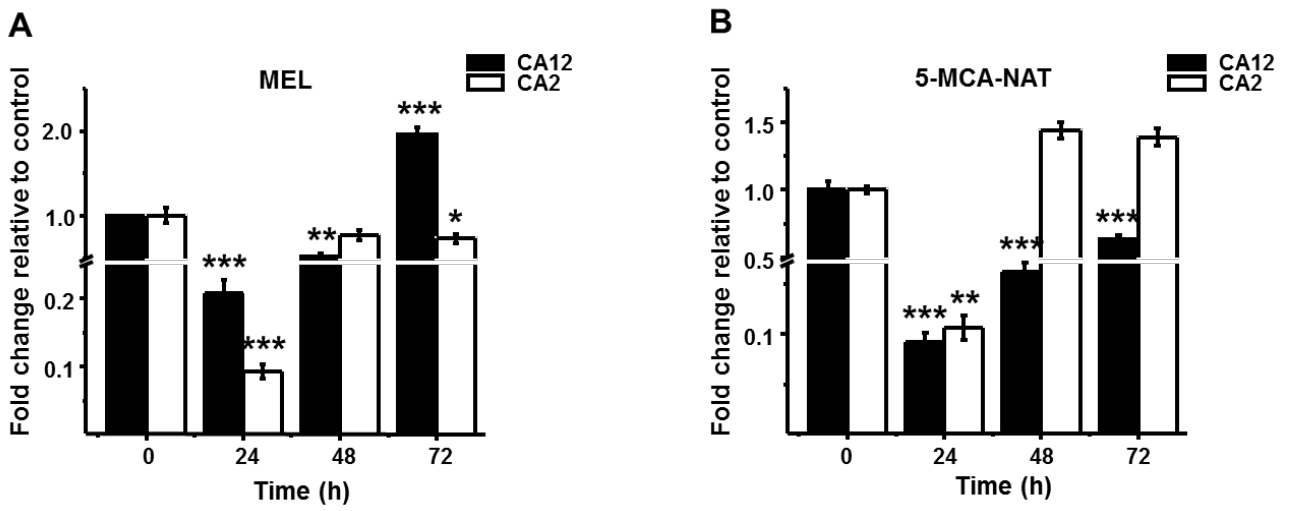


Figura 4, artículo 3

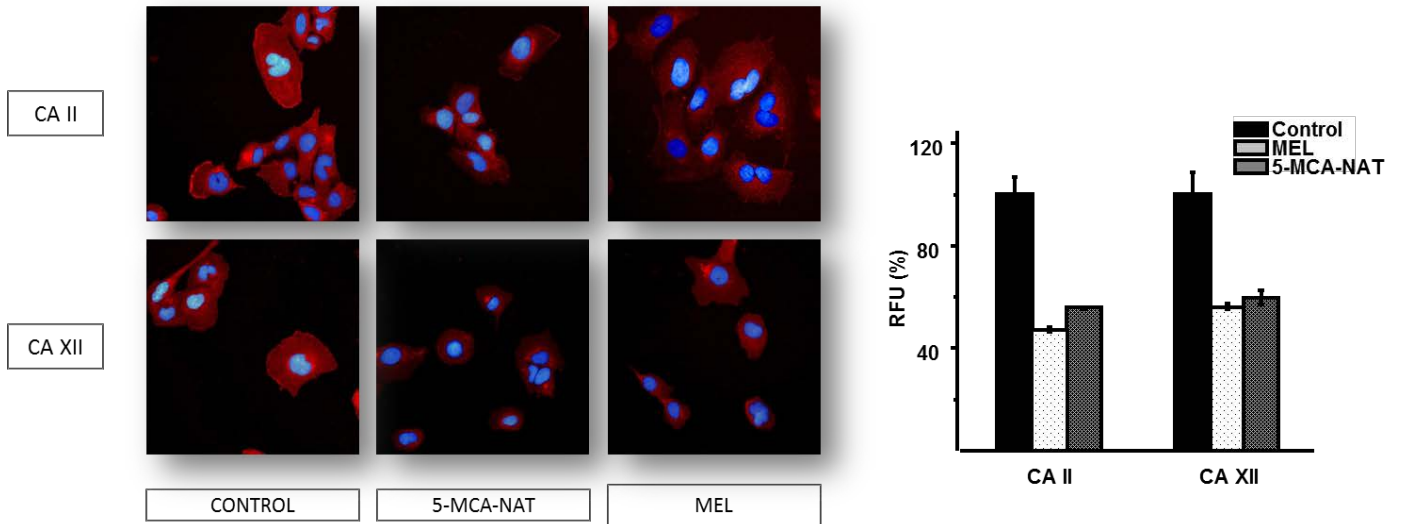


Figura 5, artículo 3

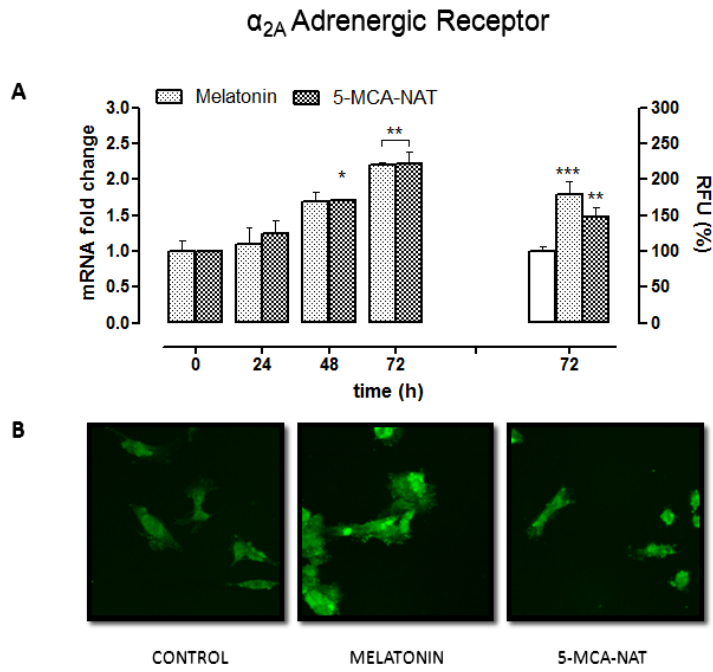


Figura 1, artículo 4

FIGURE 1

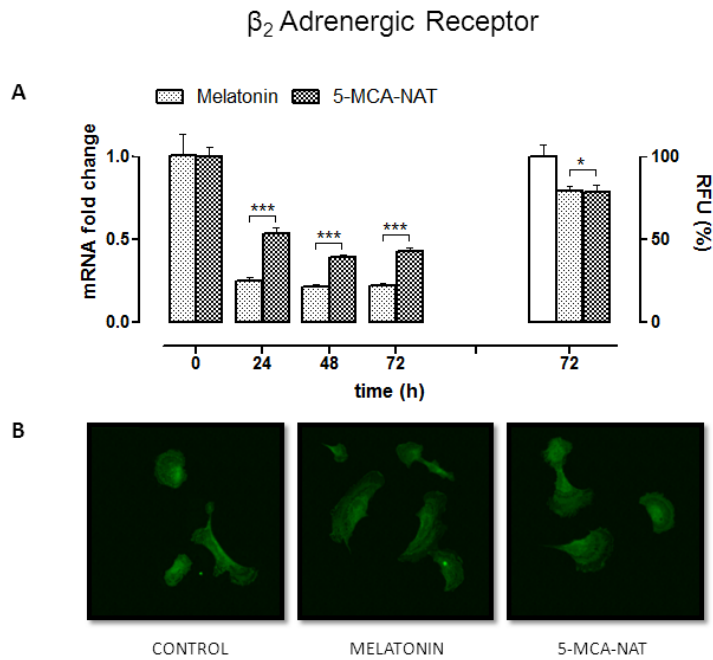


Figura 2, artículo 4

FIGURE 2

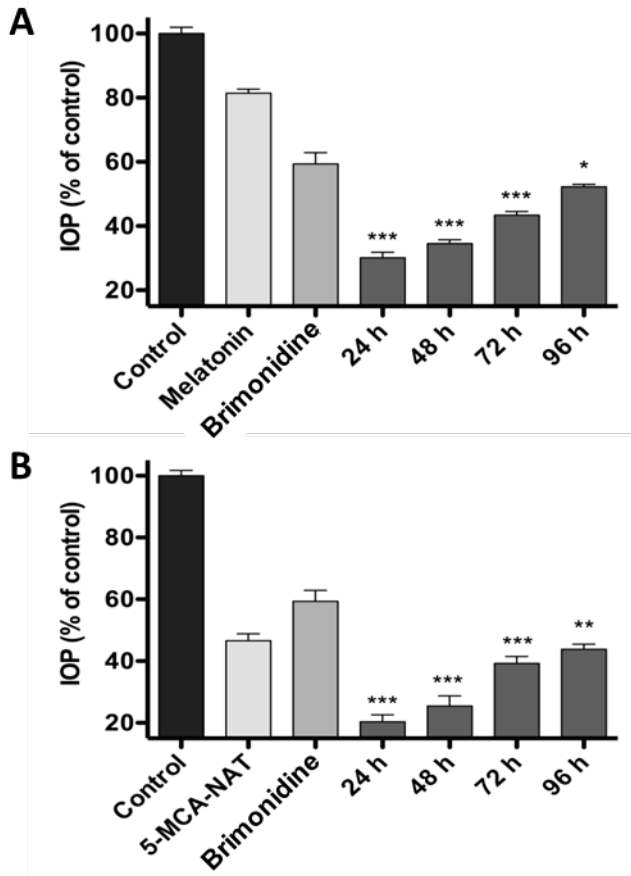


Figura 3, artículo 4

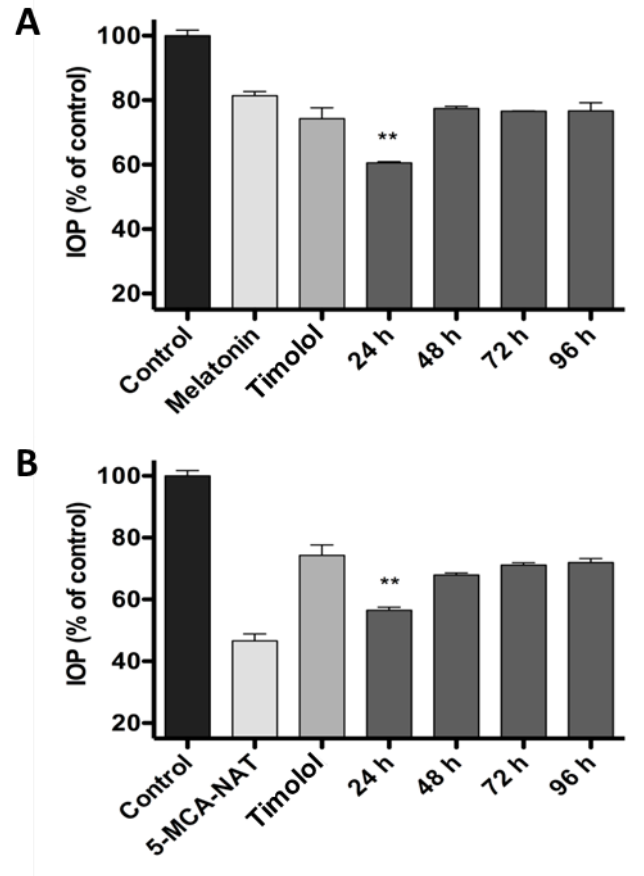


Figura 4, artículo 4

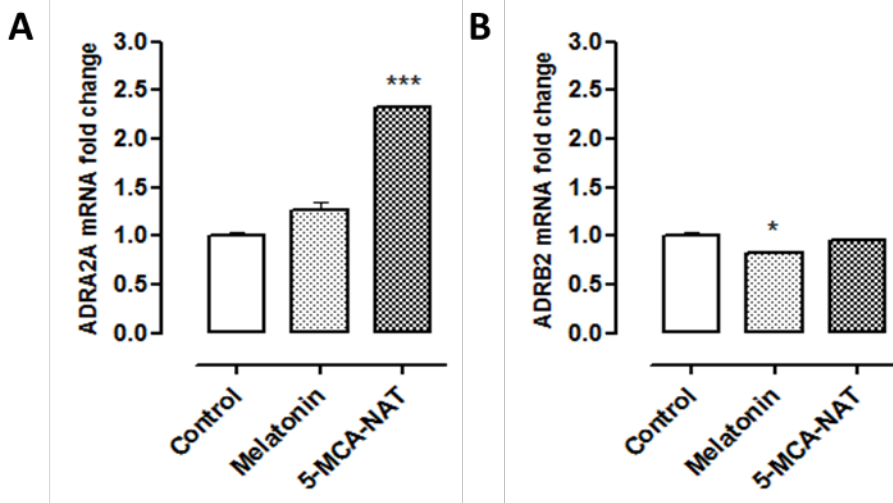


Figura 5, artículo 4



## V. Conclusiones

## V. CONCLUSIONES

Del presente trabajo experimental se extraen las siguientes conclusiones:

1. Tanto la melatonina como el 5-MCA-NAT producen una disminución de la secreción de  $\text{Cl}^-$  en células no pigmentadas inmortalizadas de epitelio ciliar de conejo, siendo el comportamiento de ambas sustancias muy parecido pero no idéntico.
2. Esta acción sobre la secreción de  $\text{Cl}^-$  en ambas sustancias es mediada por la acción de un receptor sensible a prazosín tradicionalmente identificado como el receptor de melatonina  $MT_3$ .
3. La señal de este receptor se transduce a través de un aumento en las concentraciones citosólicas de  $\text{AMP}_c$ .
4. Tanto la melatonina como el 5-MCA-NAT presentan efectos a largo plazo, sin embargo sólo el 5-MCA-NAT presenta una reducción continuada a largo plazo de los efectos hipotensores.
5. Tanto la melatonina como el 5-MCA-NAT ejercen una acción reguladora sobre la expresión génica de las anhidrasas carbónicas AC II y AC XII, que se traduce en una disminución de los niveles de estas enzimas
6. Ambos compuestos ejercen también la misma acción génica sobre los adrenoreceptores  $\beta_2$ , reduciendo los niveles de este receptor. De igual manera estos compuestos promueven un aumento de los niveles de los adrenoreceptores  $\alpha_{2A}$ .
7. La melatonina y el 5-MCA-NAT potencian los efectos hipotensores del *Trusop*<sup>®</sup>, inhibidor de anhidrasas carbónicas, el Timolol, antagonista de los adrenoreceptores  $\beta$ , y de la Brimonidina, agonista de los adrenoreceptores  $\alpha$ .



## VI. Bibliografía

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdull, M. M., C. C. Gilbert, et al. (2015). "Primary open angle glaucoma in northern Nigeria: stage at presentation and acceptance of treatment." BMC ophthalmology **15**(1): 111.
- Abe, M., M. T. Itoh, et al. (1999). "Detection of melatonin, its precursors and related enzyme activities in rabbit lens." Experimental eye research **68**(2): 255-262.
- Agorastos, A. and C. G. Huber (2011). "The role of melatonin in glaucoma: implications concerning pathophysiological relevance and therapeutic potential." Journal of pineal research **50**(1): 1-7.
- Ahmed, R., S. Mahavadi, et al. (2013). "Characterization of signaling pathways coupled to melatonin receptors in gastrointestinal smooth muscle." Regulatory peptides **184**: 96-103.
- Alañón, F. J. and S. Ferreiro (2003). Glaucoma. Oftalmología en atención primaria. Alcalá la Real (Jaen), Formación Alcalá.
- Alarma-Estrany, P., A. Crooke, et al. (2008). "Sympathetic nervous system modulates the ocular hypotensive action of MT2-melatonin receptors in normotensive rabbits." Journal of pineal research **45**(4): 468-475.
- Alarma-Estrany, P., A. Crooke, et al. (2007). "Requirement of intact sympathetic transmission for the ocular hypotensive effects of melatonin and 5-MCA-NAT." Auton Neurosci **137**(1-2): 63-66.
- Alarma-Estrany, P., A. Crooke, et al. (2009). "5-MCA-NAT does not act through NQO2 to reduce intraocular pressure in New-Zealand white rabbit." J Pineal Res **47**(2): 201-209.
- Alarma-Estrany, P., A. Guzman-Aranguez, et al. (2011). "Design of novel melatonin analogs for the reduction of intraocular pressure in normotensive rabbits." J Pharmacol Exp Ther **337**(3): 703-709.
- Almasieh, M., A. M. Wilson, et al. (2012). "The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma." Progress in retinal and eye research **31**(2): 152-181.
- Anguita, J., M. L. Chalfant, et al. (1995). "Molecular cloning of the human volume-sensitive chloride conductance regulatory protein, pCl<sub>n</sub>, from ocular ciliary epithelium." Biochemical and biophysical research communications **208**(1): 89-95.
- Anisimov, S. V. and N. Popovic (2004). "Genetic aspects of melatonin biology." Rev Neurosci **15**(3): 209-230.
- Aoyagi, M., A. S. Arvai, et al. (2003). "Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin." The EMBO journal **22**(4): 766-775.
- Arendt, J. (1998). "Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology." Reviews of reproduction **3**(1): 13-22.
- Avila, M. Y., C. H. Mitchell, et al. (2003). "Noninvasive assessment of aqueous humor turnover in the mouse eye." Investigative ophthalmology & visual science **44**(2): 722-727.

- Avila, M. Y., R. W. Seidler, et al. (2002). "Inhibitors of NHE-1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange reduce mouse intraocular pressure." Investigative ophthalmology & visual science **43**(6): 1897-1902.
- Axelrod, J. (1974). "The pineal gland: a neurochemical transducer." Science **184**(4144): 1341-1348.
- Ayoub, M. A., C. Couturier, et al. (2002). "Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer." The Journal of biological chemistry **277**(24): 21522-21528.
- Ayoub, M. A., A. Levoye, et al. (2004). "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers." Molecular pharmacology **66**(2): 312-321.
- Baba, K., A. Benleulmi-Chaachoua, et al. (2013). "Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function." Science signaling **6**(296): ra89.
- Bar-Ilan, A., N. I. Pessah, et al. (1984). "The effects of carbonic anhydrase inhibitors on aqueous humor chemistry and dynamics." Investigative ophthalmology & visual science **25**(10): 1198-1205.
- Bartness, T. J. and B. D. Goldman (1989). "Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons." Experientia **45**(10): 939-945.
- Beck-Friis, J., B. F. Kjellman, et al. (1985). "Serum melatonin in relation to clinical variables in patients with major depressive disorder and a hypothesis of a low melatonin syndrome." Acta psychiatrica Scandinavica **71**(4): 319-330.
- Becker, B. (1960). "Hypothermia and aqueous humor dynamics of the rabbit eye." Transactions of the American Ophthalmological Society **58**: 337-363.
- Belforte, N. A., M. C. Moreno, et al. (2010). "Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma." Journal of pineal research **48**(4): 353-364.
- Beneyto Martín, P. (1991). Estudio de la dinámica del humor acuoso mediante fluorofotometría en el glaucoma de ángulo abierto, Universidad Complutense de Madrid.
- Benitez-King, G. and F. Anton-Tay (1993). "Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects." Experientia **49**(8): 635-641.
- Benitez-King, G., M. E. Hernandez, et al. (2001). "Melatonin activates PKC-alpha but not PKC-epsilon in N1E-115 cells." Neurochem Int **39**(2): 95-102.
- Bergmanson, J. P. (1982). "Neural control of intraocular pressure." American journal of optometry and physiological optics **59**(1): 94-98.
- Berman, E. R. (1991). Aqueous, iris-ciliary, and trabeculum. Biochemistry of the eye. C. Blakemore. New York, Plenum Press: 151.
- Beydemir, S. and I. Gulcin (2004). "Effects of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo." J Enzyme Inhib Med Chem **19**(2): 193-197.
- Bill, A. (1966). "Formation and Drainage of Aqueous Humour in Cats." Experimental Eye Research **5**(3): 185-&.

- Bill, A. (1970). "The Effect of Changes in Arterial Blood Pressure on the Rate of Aqueous Humour Formation in a Primate (*Cercopithecus ethiops*)."  
Ophthalmic Research **1**(4): 193-200.
- Bill, A. (1970). "Effects of norepinephrine, isoproterenol and sympathetic stimulation on aqueous humour dynamics in vervet monkeys."  
Experimental eye research **10**(1): 31-46.
- Bill, A. and E. H. Barany (1966). "Gross facility, facility of conventional routes, and pseudofacility of aqueous humor outflow in the cynomolgus monkey. The reduction in aqueous humor formation rate caused by moderate increments in intraocular pressure." Archives of ophthalmology **75**(5): 665-673.
- Bonnefont-Rousselot, D., F. Collin, et al. (2011). "Reaction mechanism of melatonin oxidation by reactive oxygen species in vitro." Journal of pineal research **50**(3): 328-335.
- Bonting, S. L. and B. Becker (1964). "Studies on Sodium-Potassium Activated Adenosinetriphosphatase. Xiv. Inhibition of Enzyme Activity and Aqueous Humor Flow in the Rabbit Eye after Intravitreal Injection of Ouabain." Investigative ophthalmology **3**: 523-533.
- Bonting, S. L., K. A. Simon, et al. (1961). "Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat." Archives of biochemistry and biophysics **95**: 416-423.
- Bouvier, M., N. Heveker, et al. (2007). "BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better." Nat Methods **4**(1): 3-4; author reply 4.
- Bowler, J. M., D. Peart, et al. (1996). "Electron probe X-ray microanalysis of rabbit ciliary epithelium." Experimental eye research **62**(2): 131-139.
- Bromberg, B. B., D. S. Gregory, et al. (1980). "Beta-adrenergic receptors in ciliary processes of the rabbit." Investigative ophthalmology & visual science **19**(2): 203-207.
- Brubaker, R. F. (1991). "Flow of aqueous humor in humans [The Friedenwald Lecture]." Investigative ophthalmology & visual science **32**(13): 3145-3166.
- Brubaker, R. F. (1998). Clinical measurement of aqueous dynamics: Implications for addressing glaucoma. The Eye's Aqueous Humor: From Secretion to Glaucoma. M. M. Civan. San Diego, Academic Press: 234-284.
- Brubaker, R. F., S. Nagataki, et al. (1981). "The effect of age on aqueous humor formation in man." Ophthalmology **88**(3): 283-288.
- Brydon, L., F. Roka, et al. (1999). "Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins." Molecular endocrinology **13**(12): 2025-2038.
- Bubis, M. and N. Zisapel (1999). "Involvement of cGMP in cellular melatonin responses." Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization **91**(1): 45-49.
- Burkhardt, S., R. J. Reiter, et al. (2001). "DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid." The international journal of biochemistry & cell biology **33**(8): 775-783.

- Bylund, D. B. (1995). "Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes." Annals of the New York Academy of Sciences **763**: 1-7.
- Bylund, D. B., H. S. Blaxall, et al. (1992). "Pharmacological characteristics of alpha 2-adrenergic receptors: comparison of pharmacologically defined subtypes with subtypes identified by molecular cloning." Molecular pharmacology **42**(1): 1-5.
- Bylund, D. B. and D. M. Chacko (1999). "Characterization of alpha2 adrenergic receptor subtypes in human ocular tissue homogenates." Investigative ophthalmology & visual science **40**(10): 2299-2306.
- Caprioli, J. and M. Sears (1983). "Forskolin lowers intraocular pressure in rabbits, monkeys, and man." Lancet **1**(8331): 958-960.
- Caprioli, J. and M. Sears (1984). "Combined effect of forskolin and acetazolamide on intraocular pressure and aqueous flow in rabbit eyes." Experimental eye research **39**(1): 47-50.
- Cardinali, D. P. (1981). "Melatonin. I A mammalian pineal hormone." Endocrine reviews **2**(3): 327-346.
- Carlberg, C. and I. Wiesenberg (1995). "The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship." Journal of pineal research **18**(4): 171-178.
- Carlson, L. L., D. R. Weaver, et al. (1989). "Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein." Endocrinology **125**(5): 2670-2676.
- Carre, D. A. and M. M. Civan (1995). "cGMP modulates transport across the ciliary epithelium." The Journal of membrane biology **146**(3): 293-305.
- Carre, D. A., C. H. Mitchell, et al. (2000). "Similarity of A(3)-adenosine and swelling-activated Cl(-) channels in nonpigmented ciliary epithelial cells." American journal of physiology. Cell physiology **279**(2): C440-451.
- Carre, D. A., C. S. Tang, et al. (1992). "Effect of bicarbonate on intracellular potential of rabbit ciliary epithelium." Current eye research **11**(7): 609-624.
- Carrillo-Vico, A., J. M. Guerrero, et al. (2005). "A review of the multiple actions of melatonin on the immune system." Endocrine **27**(2): 189-200.
- Carta, F., C. T. Supuran, et al. (2012). "Novel therapies for glaucoma: a patent review 2007 - 2011." Expert opinion on therapeutic patents **22**(1): 79-88.
- Caulfield, M. P. (1993). "Muscarinic receptors--characterization, coupling and function." Pharmacology & therapeutics **58**(3): 319-379.
- Civan, M. M. (1998). "Transport components of net secretion of the aqueous humor and their integrated regulation." Eye's Aqueous Humor **45**: 1-24.
- Civan, M. M. (2003). "The fall and rise of active chloride transport: implications for regulation of intraocular pressure." Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology **300**(1): 5-13.
- Civan, M. M., M. Coca-Prados, et al. (1994). "Pathways signaling the regulatory volume decrease of cultured nonpigmented ciliary epithelial cells." Investigative ophthalmology & visual science **35**(6): 2876-2886.
- Civan, M. M., M. Coca-Prados, et al. (1996). "Regulatory volume increase of human non-pigmented ciliary epithelial cells." Experimental eye research **62**(6): 627-640.
- Civan, M. M. and A. D. Macknight (2004). "The ins and outs of aqueous humour secretion." Experimental eye research **78**(3): 625-631.

- Civan, M. M., K. Peterson-Yantorno, et al. (1997). "Potential contribution of epithelial Na<sup>+</sup> channel to net secretion of aqueous humor." The Journal of experimental zoology **279**(5): 498-503.
- Cleary, L., C. Vandeputte, et al. (2002). "Investigation of neurotransmission in vas deferens from alpha(2A/D)-adrenoceptor knockout mice." British journal of pharmacology **136**(6): 857-864.
- Coakes, R. L. and R. F. Brubaker (1978). "The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure. In the normal eye." Archives of ophthalmology **96**(11): 2045-2048.
- Coca-Prados, M., J. Anguita, et al. (1995). "PKC-sensitive Cl<sup>-</sup> channels associated with ciliary epithelial homologue of pICln." The American journal of physiology **268**(3 Pt 1): C572-579.
- Coca-Prados, M., S. Ghosh, et al. (1992). "Expression and cellular distribution of the alpha 1 gap junction gene product in the ocular pigmented ciliary epithelium." Current eye research **11**(2): 113-122.
- Coca-Prados, M. and L. G. Lopez-Briones (1987). "Evidence that the alpha and alpha (+)isoforms of the catalytic subunit of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase reside in distinct ciliary epithelial cells of the mammalian eye." Biochemical and biophysical research communications **145**(1): 460-466.
- Coca-Prados, M. and J. Sanchez-Torres (1998). Molecular approaches to the study of the NA<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase and chloride channels in the ocular ciliary epithelium. The eye's aqueous humor: from secretion to glaucoma. M. M. Civan. San Diego, Academic Press: 25-53.
- Coca-Prados, M., J. Sanchez-Torres, et al. (1996). "Association of ClC-3 channel with Cl<sup>-</sup> transport by human nonpigmented ciliary epithelial cells." The Journal of membrane biology **150**(2): 197-208.
- Coffey, K. L., A. Krushinsky, et al. (2002). "Molecular profiling and cellular localization of connexin isoforms in the rat ciliary epithelium." Experimental eye research **75**(1): 9-21.
- Cole, D. F. (1966). "Aqueous Humour Formation." Documenta Ophthalmologica **21**: 116-&.
- Cole, D. F. (1977). "Secretion of the aqueous humour." Experimental eye research **25 Suppl**: 161-176.
- Collison, D. J., R. A. Coleman, et al. (2000). "Characterization of muscarinic receptors in human lens cells by pharmacologic and molecular techniques." Investigative ophthalmology & visual science **41**(9): 2633-2641.
- Conti, A., S. Conconi, et al. (2000). "Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells." Journal of pineal research **28**(4): 193-202.
- Coon, S. L., S. K. McCune, et al. (1997). "Regulation of pineal alpha1B-adrenergic receptor mRNA: day/night rhythm and beta-adrenergic receptor/cyclic AMP control." Molecular pharmacology **51**(4): 551-557.
- Cordeiro, M. F. and L. A. Levin (2011). "Clinical evidence for neuroprotection in glaucoma." American journal of ophthalmology **152**(5): 715-716.
- Coulangeon, L. M., M. Sole, et al. (1990). "[Aqueous humor flow measured by fluorophotometry. A comparative study of the effect of various beta-blocker eyedrops in patients with ocular hypertension]." Ophtalmologie : organe de la Societe francaise d'ophtalmologie **4**(2): 156-161.

- Counillon, L., N. Touret, et al. (2000). "Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-antiporters of bovine pigmented ciliary epithelial cells." Pflugers Archiv : European journal of physiology **440**(5): 667-678.
- Crider, J. Y. and N. A. Sharif (2002). "Adenylyl cyclase activity mediated by beta-adrenoceptors in immortalized human trabecular meshwork and non-pigmented ciliary epithelial cells." Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics **18**(3): 221-230.
- Crook, R. B. and A. T. Chang (1997). "Differential regulation of natriuretic peptide receptors on ciliary body epithelial cells." The Biochemical journal **324 ( Pt 1)**: 49-55.
- Crook, R. B. and J. R. Polansky (1994). "Stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> cotransport by forskolin-activated adenylyl cyclase in fetal human nonpigmented epithelial cells." Investigative ophthalmology & visual science **35**(9): 3374-3383.
- Crook, R. B., K. Takahashi, et al. (2000). "The role of NaKCl cotransport in blood-to-aqueous chloride fluxes across rabbit ciliary epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **41**(9): 2574-2583.
- Crooke, A., B. Colligris, et al. (2012). "Update in glaucoma medicinal chemistry: emerging evidence for the importance of melatonin analogues." Current medicinal chemistry **19**(21): 3508-3522.
- Chan, J. S., J. W. Lee, et al. (2000). "Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors." Molecular pharmacology **57**(4): 700-708.
- Chanut, E., J. Nguyen-Legros, et al. (1998). "Determination of melatonin in rat pineal, plasma and retina by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection." Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications **709**(1): 11-18.
- Chen, L., X. He, et al. (2014). "Melatonin receptor type 1 signals to extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 via Gi and Gs dually coupled pathways in HEK-293 cells." Biochemistry **53**(17): 2827-2839.
- Chen, L., L. Wang, et al. (1999). "Association of intrinsic pICln with volume-activated Cl<sup>-</sup> current and volume regulation in a native epithelial cell." The American journal of physiology **276**(1 Pt 1): C182-192.
- Chen, S., R. Inoue, et al. (1994). "Role of cyclic AMP-induced Cl<sup>-</sup> conductance in aqueous humor formation by the dog ciliary epithelium." British journal of pharmacology **112**(4): 1137-1145.
- Chen, S. and M. Sears (1997). "A low conductance chloride channel in the basolateral membranes of the non-pigmented ciliary epithelium of the rabbit eye." Current eye research **16**(7): 710-718.
- Chiou, G. C. (1983). "Effects of alpha 1 and alpha 2 activation of adrenergic receptors on aqueous humor dynamics." Life sciences **32**(15): 1699-1704.
- Chiquet, C., B. Claustrat, et al. (2006). "Melatonin concentrations in aqueous humor of glaucoma patients." American journal of ophthalmology **142**(2): 325-327 e321.
- Chu, T. C. and O. A. Candia (1985). "Effects of adrenergic agonists and cyclic AMP on the short-circuit current across the isolated rabbit iris-ciliary body." Current eye research **4**(4): 523-529.

- Chu, T. C., O. A. Candia, et al. (1986). "Effects of forskolin, prostaglandin F<sub>2</sub> alpha, and Ba<sup>2+</sup> on the short-circuit current of the isolated rabbit iris-ciliary body." Current eye research **5**(7): 511-516.
- Chu, T. C., O. A. Candia, et al. (1987). "Electrical parameters of the isolated monkey ciliary epithelium and effects of pharmacological agents." Investigative ophthalmology & visual science **28**(10): 1644-1648.
- Dailey, R. A., R. F. Brubaker, et al. (1982). "The Effects of Timolol Maleate and Acetazolamide on the Rate of Aqueous Formation in Normal Human-Subjects." American Journal of Ophthalmology **93**(2): 232-237.
- Dartt, D. A. (2001). "Regulation of lacrimal gland secretion by neurotransmitters and the EGF family of growth factors." Experimental eye research **73**(6): 741-752.
- Davson, H. and L. T. Graham (1974). The Eye: Comparative Physiology. New York, Academic Press,.
- Delamere, N. A. (2006). Ciliary body and ciliary epithelium. The Biology of the Eye. J. Fischbarg. New York, Elsevier. **10**: 127-149.
- Delamere, N. A. and K. L. King (1992). "The influence of cyclic AMP upon Na,K-ATPase activity in rabbit ciliary epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **33**(2): 430-435.
- Djeridane, Y., B. Vivien-Roels, et al. (1998). "Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study." Journal of pineal research **25**(1): 54-64.
- Do, C. W. and M. M. Civan (2004). "Basis of chloride transport in ciliary epithelium." The Journal of membrane biology **200**(1): 1-13.
- Do, C. W., C. W. Kong, et al. (2004). "cAMP inhibits transepithelial chloride secretion across bovine ciliary body/epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **45**(10): 3638-3643.
- Do, C. W. and C. H. To (2000). "Chloride secretion by bovine ciliary epithelium: a model of aqueous humor formation." Investigative ophthalmology & visual science **41**(7): 1853-1860.
- Dominguez-Rodriguez, A., P. Abreu-Gonzalez, et al. (2009). "Clinical aspects of melatonin in the acute coronary syndrome." Current vascular pharmacology **7**(3): 367-373.
- Domínguez-Rodríguez, A., S. Samimi-Fard, et al. (2009). "Melatonina y aterosclerosis coronaria." Clínica e Investigación en Arteriosclerosis **21**(05): 247-256.
- Dong, J. and N. A. Delamere (1994). "Protein kinase C inhibits Na(+)-K(+)-2Cl<sup>-</sup> cotransporter activity in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium." The American journal of physiology **267**(6 Pt 1): C1553-1560.
- Dortch-Carnes, J. and G. Tosini (2013). "Melatonin receptor agonist-induced reduction of SNP-released nitric oxide and cGMP production in isolated human non-pigmented ciliary epithelial cells." Experimental eye research **107**: 1-10.
- Dubocovich, M. L. (1988). "Pharmacology and function of melatonin receptors." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **2**(12): 2765-2773.
- Dubocovich, M. L. (1995). "Melatonin receptors: are there multiple subtypes?" Trends in pharmacological sciences **16**(2): 50-56.

- Dubocovich, M. L., D. P. Cardinali, et al. (1998). Melatonin Receptors. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification. London, IUPHAR Media: 187-193.
- Dubocovich, M. L., M. I. Masana, et al. (2000). Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes, Melatonin after Four Decades. J. Olcese. New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers: 181-188.
- Dunn, J. J., C. Lytle, et al. (2001). "Immunolocalization of the Na-K-Cl cotransporter in bovine ciliary epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **42**(2): 343-353.
- Duquette, P. P., P. Bissonnette, et al. (2001). "Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na(+)/glucose cotransport." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(7): 3796-3801.
- Ebisawa, T., S. Karne, et al. (1994). "Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(13): 6133-6137.
- Edelman, J. L., D. D. Loo, et al. (1995). "Characterization of potassium and chloride channels in the basolateral membrane of bovine nonpigmented ciliary epithelial cells." Investigative ophthalmology & visual science **36**(13): 2706-2716.
- Edelman, J. L., G. Sachs, et al. (1994). "Ion transport asymmetry and functional coupling in bovine pigmented and nonpigmented ciliary epithelial cells." The American journal of physiology **266**(5 Pt 1): C1210-1221.
- Eichhorn, M., C. Flugel, et al. (1990). "[Regional differences in the ciliary body of cattle. An electron microscopy and histochemical study]." Fortschritte der Ophthalmologie : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft **87**(3): 241-246.
- Eison, A. S. and U. L. Mullins (1993). "Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in Syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells." Life sciences **53**(24): PL393-398.
- Ellis, D. Z., J. A. Nathanson, et al. (2001). "Carbachol and nitric oxide inhibition of Na,K-ATPase activity in bovine ciliary processes." Investigative ophthalmology & visual science **42**(11): 2625-2631.
- Entrena, A., M. E. Camacho, et al. (2005). "Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors." Journal of medicinal chemistry **48**(26): 8174-8181.
- Esparza, J. L., M. Gomez, et al. (2005). "Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats." J Pineal Res **39**(2): 129-136.
- Feldman, R. M., R. H. Stewart, et al. (2008). "24-hour control of intraocular pressure with 2% dorzolamide/0.5% timolol fixed-combination ophthalmic solution in open-angle glaucoma." Current medical research and opinion **24**(8): 2403-2412.
- Fleischhauer, J. C., C. H. Mitchell, et al. (2001). "PGE(2), Ca(2+), and cAMP mediate ATP activation of Cl(-) channels in pigmented ciliary epithelial cells." American journal of physiology. Cell physiology **281**(5): C1614-1623.

- Flugel, C. and E. Lutjen-Drecoll (1988). "Presence and distribution of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the ciliary epithelium of the rabbit." Histochemistry **88**(3-6): 613-621.
- Forrester, J. V., Ed. (2002). The Eye. Basic Sciences in practice. Anatomy of the eye and orbit, Sanders Ltd.
- Freddo, T. F. (1987). "Intercellular junctions of the ciliary epithelium in anterior uveitis." Investigative ophthalmology & visual science **28**(2): 320-329.
- Friedenwald, J. S. (1955). "Carbonic anhydrase inhibition and aqueous flow." Am J Ophthalmol **39**(4, Part 2): 59-64.
- Gabelt, B. T., M. Wiederholt, et al. (1997). "Anterior segment physiology after bumetanide inhibition of Na-K-Cl cotransport." Investigative ophthalmology & visual science **38**(9): 1700-1707.
- Gagnon, M. P., P. Bissonnette, et al. (2004). "Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na<sup>+</sup>/glucose cotransport." Biophysical journal **86**(1 Pt 1): 125-133.
- Galano, A., D. X. Tan, et al. (2013). "On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK." Journal of pineal research **54**(3): 245-257.
- Gaul, G. R., N. J. Will, et al. (1989). "Comparison of a noncardioselective beta-adrenoceptor blocker and a cardioselective blocker in reducing aqueous flow in humans." Archives of ophthalmology **107**(9): 1308-1311.
- Gerdin, M. J., M. I. Masana, et al. (2003). "Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **304**(3): 931-939.
- Gharagozloo, N. Z., R. S. Larson, et al. (1988). "Terbutaline stimulates aqueous humor flow in humans during sleep." Archives of ophthalmology **106**(9): 1218-1220.
- Gharagozloo, N. Z., S. J. Relf, et al. (1988). "Aqueous flow is reduced by the alpha-adrenergic agonist, apraclonidine hydrochloride (ALO 2145)." Ophthalmology **95**(9): 1217-1220.
- Ghosh, S., A. C. Freitag, et al. (1990). "Cellular distribution and differential gene expression of the three alpha subunit isoforms of the Na,K-ATPase in the ocular ciliary epithelium." The Journal of biological chemistry **265**(5): 2935-2940.
- Ghosh, S., N. Hernando, et al. (1991). "Expression of multiple Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase genes reveals a gradient of isoforms along the nonpigmented ciliary epithelium: functional implications in aqueous humor secretion." Journal of cellular physiology **149**(2): 184-194.
- Gilad, E., H. Matzkin, et al. (1997). "Inactivation of melatonin receptors by protein kinase C in human prostate epithelial cells." Endocrinology **138**(10): 4255-4261.
- Gimbel, H. V. (1973). "The control of myopia with atropine." Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie **8**(4): 527-532.
- Glasser, A. D. (2011). Accomodation. Adler's Physiology of the Eye
- L. A. Levin, S. F. E. Nilsson, J. V. Hoeve et al. London, Saunders-Elsevier: 44-45.
- Godson, C. and S. M. Reppert (1997). "The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways." Endocrinology **138**(1): 397-404.

- Green, K., C. Bountra, et al. (1985). "An electrophysiologic study of rabbit ciliary epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **26**(3): 371-381.
- Gwin, R. M., K. N. Gelatt, et al. (1979). "Adrenergic and cholinergic innervation of the anterior segment of the normal and glaucomatous dog." Investigative ophthalmology & visual science **18**(7): 674-682.
- H, D. (1990). The aqueous humour and the intraocular pressure. Physiology of the eye. D. H. London, Macmillan Press: 3-95.
- Hageman, G. S., X. L. Zhu, et al. (1991). "Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(7): 2716-2720.
- Hart, W. M. (1992). Intraocular pressure. Adler's physiology of the eye. W. M. Hart. St. Louis, Mosby: 248-267.
- Hein, L. (2001). "Transgenic models of alpha 2-adrenergic receptor subtype function." Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology **142**: 161-185.
- Helbig, H., C. Korbmayer, et al. (1989). "Coupling of <sup>22</sup>Na and <sup>36</sup>Cl uptake in cultured pigmented ciliary epithelial cells: a proposed role for the isoenzymes of carbonic anhydrase." Current eye research **8**(11): 1111-1119.
- Hermoso, M., C. M. Satterwhite, et al. (2002). "ClC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes." The Journal of biological chemistry **277**(42): 40066-40074.
- Hilvo, M., M. Tolvanen, et al. (2005). "Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase." The Biochemical journal **392**(Pt 1): 83-92.
- Hirose, T., R. J. Smith, et al. (1994). "ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle." Biochemical and biophysical research communications **205**(3): 1976-1983.
- Hirota, A., Y. Kiuchi, et al. (1997). "Response and level of beta-adrenergic, vasoactive intestinal peptide, and PACAP receptors during the circadian cycle." Investigative ophthalmology & visual science **38**(9): 1708-1718.
- Holland, M. G. and C. C. Gipson (1970). "Chloride ion transport in the isolated ciliary body." Investigative ophthalmology **9**(1): 20-29.
- Horio, B., M. Sears, et al. (1996). "Regulation and bioelectrical effects of cyclic adenosine monophosphate production in the ciliary epithelial bilayer." Investigative ophthalmology & visual science **37**(4): 607-612.
- Huang, P., E. R. Lazarowski, et al. (2001). "Compartmentalized autocrine signaling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at the apical membrane of airway epithelial cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(24): 14120-14125.
- Huang, Y., D. W. Gil, et al. (1995). "Localization of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the anterior segment of the human eye with selective antibodies." Investigative ophthalmology & visual science **36**(13): 2729-2739.
- Huether, G. (1993). "The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates." Experientia **49**(8): 665-670.

- Huether, G., B. Poeggeler, et al. (1992). "Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract." Life sciences **51**(12): 945-953.
- Iizuka, S., K. Kishida, et al. (1984). "Electrical characteristics of the isolated dog ciliary body." Current eye research **3**(3): 417-421.
- Ismail, S. A. and H. A. Mowafi (2009). "Melatonin provides anxiolysis, enhances analgesia, decreases intraocular pressure, and promotes better operating conditions during cataract surgery under topical anesthesia." Anesth Analg **108**(4): 1146-1151.
- Itoh, M. T., B. Ishizuka, et al. (1999). "Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary." Molecular human reproduction **5**(5): 402-408.
- Iuvone, P. M. and J. C. Besharse (1983). "Regulation of indoleamine N-acetyltransferase activity in the retina: effects of light and dark, protein synthesis inhibitors and cyclic nucleotide analogs." Brain research **273**(1): 111-119.
- Iwasaki, S., K. Nakazawa, et al. (2005). "Melatonin as a local regulator of human placental function." Journal of pineal research **39**(3): 261-265.
- Jacob, T. J. and M. M. Civan (1996). "Role of ion channels in aqueous humor formation." The American journal of physiology **271**(3 Pt 1): C703-720.
- Jentsch, T. J., V. Stein, et al. (2002). "Molecular structure and physiological function of chloride channels." Physiological reviews **82**(2): 503-568.
- Jimenez-Jorge, S., A. J. Jimenez-Caliani, et al. (2005). "Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland." Journal of pineal research **39**(1): 77-83.
- Kamal, M., F. Gbahou, et al. (2015). "Convergence of melatonin and serotonin (5-HT) signaling at MT2/5-HT2C receptor heteromers." The Journal of biological chemistry **290**(18): 11537-11546.
- Kamal, M. and R. Jockers (2011). "Biological Significance of GPCR Heteromerization in the Neuro-Endocrine System." Frontiers in endocrinology **2**: 2.
- Katz, I. M., W. A. Hubbard, et al. (1976). "Intraocular pressure decrease in normal volunteers following timolol ophthalmic solution." Investigative ophthalmology **15**(6): 489-492.
- Kaufman, P. L. and E. H. Barany (1976). "Loss of acute pilocarpine effect on outflow facility following surgical disinsertion and retrodisplacement of the ciliary muscle from the scleral spur in the cynomolgus monkey." Investigative ophthalmology **15**(10): 793-807.
- Kaufman, P. L. and B. T. Gabelt (2004). Hidrodinámica del humor acuoso. Adler Fisiología del ojo. P. L. Kaufman and A. A. Madrid, Elsevier: 237-289.
- Kawasaki, M., S. Uchida, et al. (1994). "Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells." Neuron **12**(3): 597-604.
- Kelly, R. W., F. Amato, et al. (1984). "N-acetyl-5-methoxy kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis." Biochemical and biophysical research communications **121**(1): 372-379.

- Kishida, K., Y. Miwa, et al. (1986). "2-Substituted 1, 3, 4-thiadiazole-5-sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors: their effects on the transepithelial potential difference of the isolated rabbit ciliary body and on the intraocular pressure of the living rabbit eye." Experimental eye research **43**(6): 981-995.
- Kishida, K., T. Sasabe, et al. (1982). "Sodium and chloride transport across the isolated rabbit ciliary body." Current eye research **2**(3): 149-152.
- Kishida, K., T. Sasabe, et al. (1981). "Electric Characteristics of the Isolated Rabbit Ciliary Body." Japanese Journal of Ophthalmology **25**(4): 407-416.
- Kittner, Z., I. Olah, et al. (1978). "Histology and ultrastructure of the the harderian glands - accessory lacrimal gland - of the chicken." Acta biologica Academiae Scientiarum Hungaricae **29**(1): 29-41.
- Klein, D. C., S. L. Coon, et al. (1997). "The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland." Recent progress in hormone research **52**: 307-357; discussion 357-308.
- Komaromy, A. M., D. E. Brooks, et al. (1998). "Diurnal intraocular pressure curves in healthy rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and rhesus macaques with normotensive and hypertensive primary open-angle glaucoma." Journal of glaucoma **7**(2): 128-131.
- Koskela, T. and R. F. Brubaker (1991). "Apraclonidine and timolol. Combined effects in previously untreated normal subjects." Archives of ophthalmology **109**(6): 804-806.
- Kripke, D. F., J. A. Elliott, et al. (2015). "Photoperiodic and circadian bifurcation theories of depression and mania." F1000Research **4**: 107.
- Krupin, T., P. S. Reinach, et al. (1984). "Transepithelial electrical measurements on the isolated rabbit iris-ciliary body." Experimental eye research **38**(2): 115-123.
- Krupin, T. a. C., M.M., Ed. (1995). The Glaucomas. St. Louis, Mosby.
- Kumanov, P., A. Tomova, et al. (2005). "Altered melatonin secretion in hypogonadal men: clinical evidence." International journal of andrology **28**(4): 234-240.
- Kvetnoy, I. M. (1999). "Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system." The Histochemical journal **31**(1): 1-12.
- la Cour, M. and B. Ehinger (2006). The retina. The Biology of the Eye. J. Fischbarg. New York, Elsevier. **10**: 191-253.
- Lahav, M., E. Melamed, et al. (1978). "Localization of beta receptors in the anterior segment of the rat eye by a fluorescent analogue of propranolol." Investigative ophthalmology & visual science **17**(7): 645-651.
- Lahiri, D. K., D. M. Chen, et al. (2005). "Amyloid, cholinesterase, melatonin, and metals and their roles in aging and neurodegenerative diseases." Annals of the New York Academy of Sciences **1056**: 430-449.
- Lai, F. P., S. M. Mody, et al. (2002). "Molecular determinants for the differential coupling of Galpha(16) to the melatonin MT1, MT2 and *Xenopus* Mel1c receptors." Journal of neurochemistry **80**(5): 736-745.
- Lee, A. J. and I. Goldberg (2011). "Emerging drugs for ocular hypertension." Expert opinion on emerging drugs **16**(1): 137-161.
- Lee, D. A., J. E. Topper, et al. (1984). "Effect of clonidine on aqueous humor flow in normal human eyes." Experimental eye research **38**(3): 239-246.

- Lee, P. Y., S. M. Podos, et al. (1984). "Effect of topically applied forskolin on aqueous humor dynamics in cynomolgus monkey." Investigative ophthalmology & visual science **25**(10): 1206-1209.
- Lee, S. J., Y. H. Jung, et al. (2014). "Melatonin enhances the human mesenchymal stem cells motility via melatonin receptor 2 coupling with Galphaq in skin wound healing." Journal of pineal research **57**(4): 393-407.
- Leibowitz, A., A. Volkov, et al. (2015). "Melatonin prevents kidney injury in a high salt diet induced hypertension model by decreasing oxidative stress." Journal of pineal research.
- Lens A, C. N. S., Ledford JK (2008). Anterior and posterior chambers. Ocular anatomy and physiology, Slack Incorporated: 67-81.
- Leon, J., G. Escames, et al. (2006). "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin." Journal of neurochemistry **98**(6): 2023-2033.
- Lerner, A. B., J. D. Case, et al. (1959). "Structure of melatonin." Journal of the American Chemical Society **81**: 6084-6085.
- Lerner, A. B., J. D. Case, et al. (1958). "Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes." Journal of the American Chemical Society **80**(10): 2587-2587.
- Lewis, P. D., B. A. Middleton, et al. (2006). "Exogenous melatonin modifies rate of sexual maturation in domestic pullets." Poultry science **85**(1): 117-122.
- Lewy, A. J., T. A. Wehr, et al. (1980). "Light suppresses melatonin secretion in humans." Science **210**(4475): 1267-1269.
- Li, H. and Z. Wu (2015). "[Research advances on relationship between ocular perfusion pressure fluctuations and glaucoma]." [Zhonghua yan ke za zhi] Chinese journal of ophthalmology **51**(6): 477-480.
- Li, X., B. Alvarez, et al. (2002). "Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger." The Journal of biological chemistry **277**(39): 36085-36091.
- Liao, S. Y., S. Ivanov, et al. (2003). "Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CAXII) in glaucoma." J Med Genet **40**(4): 257-261.
- Lin, L. L., A. Y. Lin, et al. (1992). "Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(13): 6147-6151.
- Lind, G. J., S. J. Chew, et al. (1998). "Muscarinic acetylcholine receptor antagonists inhibit chick scleral chondrocytes." Investigative ophthalmology & visual science **39**(12): 2217-2231.
- Lindskog, S. (1997). "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." Pharmacology & therapeutics **74**(1): 1-20.
- Link, R., D. Daunt, et al. (1992). "Cloning of two mouse genes encoding alpha 2-adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in the mouse alpha 2-C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding." Molecular pharmacology **42**(1): 16-27.
- Liu, G., T. Zeng, et al. (2011). "Characterization of intraocular pressure responses of the Tibetan monkey (*Macaca thibetana*)." Molecular vision **17**: 1405-1413.

- Liu, H., S. Fan, et al. (2011). "Aqueous humor dynamics during the day and night in healthy mature volunteers." Archives of ophthalmology **129**(3): 269-275.
- Liu, J. H. and R. N. Weinreb (2014). "Asymmetry of habitual 24-hour intraocular pressure rhythm in glaucoma patients." Investigative ophthalmology & visual science **55**(11): 7398-7402.
- Liu, R., J. Flammer, et al. (2002). "Forskolin upregulation of NOS I protein expression in porcine ciliary processes: a new aspect of aqueous humor regulation." Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde **219**(4): 281-283.
- Liu, X., Z. Chen, et al. (2002). "Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(1): H254-263.
- Lohse, M. J. (2010). "Dimerization in GPCR mobility and signaling." Current opinion in pharmacology **10**(1): 53-58.
- Loo, D. D., T. Zeuthen, et al. (1996). "Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(23): 13367-13370.
- Lopez-Gonzalez, M. A., J. R. Calvo, et al. (1992). "Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating cyclic AMP production in human lymphocytes." Journal of pineal research **12**(4): 174-180.
- Lutjen-Drecoll, E. and G. Lonnerholm (1981). "Carbonic anhydrase distribution in the rabbit eye by light and electron microscopy." Investigative ophthalmology & visual science **21**(6): 782-797.
- Lutjen-Drecoll, E., G. Lonnerholm, et al. (1983). "Carbonic anhydrase distribution in the human and monkey eye by light and electron microscopy." Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie **220**(6): 285-291.
- MacDonald, E., B. K. Kobilka, et al. (1997). "Gene targeting--homing in on alpha 2-adrenoceptor-subtype function." Trends in pharmacological sciences **18**(6): 211-219.
- Mackenzie, R. S., M. A. Melan, et al. (2002). "Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure." Biochemical pharmacology **63**(4): 587-595.
- MacKinnon, A. C., M. Spedding, et al. (1994). "Alpha 2-adrenoceptors: more subtypes but fewer functional differences." Trends in pharmacological sciences **15**(4): 119-123.
- Maharaj, D. S., S. Anoopkumar-Dukie, et al. (2002). "The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals." Journal of pineal research **32**(4): 257-261.
- Maharaj, D. S., J. L. Limson, et al. (2003). "6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation." Life sciences **72**(12): 1367-1375.
- Mailliet, F., G. Ferry, et al. (2004). "Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT3." FEBS letters **578**(1-2): 116-120.
- Makabe, R. (1966). "[Ophthalmological studies with dichlorophenylaminoimidazoline with special regard to its effect on

- intraocular pressure]." Deutsche medizinische Wochenschrift **91**(38): 1686-1688.
- Markey, S. P., S. Higa, et al. (1985). "- The correlation between human plasma melatonin levels and urinary." Clin Chim Acta **150**(3): 221-225.
- Martin, X. D., H. Z. Malina, et al. (1992). "The ciliary body--the third organ found to synthesize indoleamines in humans." European journal of ophthalmology **2**(2): 67-72.
- Martinuzzo, M., M. M. Del Zar, et al. (1991). "Melatonin effect on arachidonic acid metabolism to cyclooxygenase derivatives in human platelets." Journal of pineal research **11**(3-4): 111-115.
- Matsui, H., M. Murakami, et al. (1996). "Membrane carbonic anhydrase (IV) and ciliary epithelium. Carbonic anhydrase activity is present in the basolateral membranes of the non-pigmented ciliary epithelium of rabbit eyes." Experimental Eye Research **62**(4): 409-417.
- Matuszak, Z., M. A. Bilska, et al. (2003). "Interaction of singlet molecular oxygen with melatonin and related indoles." Photochemistry and photobiology **78**(5): 449-455.
- Maus, T. L., C. Nau, et al. (1999). "Comparison of the early effects of brimonidine and apraclonidine as topical ocular hypotensive agents." Archives of ophthalmology **117**(5): 586-591.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz, et al. (2002). "Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression." Cell Mol Life Sci **59**(10): 1706-1713.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz, et al. (2005). "Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages." Journal of neuroimmunology **165**(1-2): 139-149.
- McArthur, A. J., A. E. Hunt, et al. (1997). "Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn." Endocrinology **138**(2): 627-634.
- McCannel, C. A., S. R. Heinrich, et al. (1992). "Acetazolamide but not timolol lowers aqueous humor flow in sleeping humans." Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie **230**(6): 518-520.
- McLaren, J. W. (2009). "Measurement of aqueous humor flow." Exp Eye Res **88**(4): 641-647.
- McLaughlin, C. W., A. D. Macknight, et al. (2001). Effects of ouabain on ciliary epithelial cell composition. A. I. U. Physiol. **651**.
- McLaughlin, C. W., D. Peart, et al. (1998). "Effects of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> on cell composition of rabbit ciliary epithelium: a new model for aqueous humor secretion." Investigative ophthalmology & visual science **39**(9): 1631-1641.
- McLaughlin, C. W., D. Peart, et al. (2001). "Timolol may inhibit aqueous humor secretion by cAMP-independent action on ciliary epithelial cells." American journal of physiology. Cell physiology **281**(3): C865-875.
- McLaughlin, C. W., S. Zellhuber-McMillan, et al. (2004). "Electron microprobe analysis of ouabain-exposed ciliary epithelium: PE-NPE cell couplets form the functional units." American journal of physiology. Cell physiology **286**(6): C1376-1389.

- McLaughlin, C. W., S. Zellhuber-McMillan, et al. (2001). "Regional differences in ciliary epithelial cell transport properties." The Journal of membrane biology **182**(3): 213-222.
- Menendez-Pelaez, A., K. A. Howes, et al. (1987). "N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the Harderian glands of the female Syrian hamster: changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration." Biochemical and biophysical research communications **145**(3): 1231-1238.
- Mhatre, M. C., A. S. van Jaarsveld, et al. (1988). "Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation." Biochemical and biophysical research communications **153**(3): 1186-1192.
- Mindel, J. S. and T. W. Mittag (1976). "Choline acetyltransferase in ocular tissues of rabbits, cats, cattle, and man." Investigative ophthalmology **15**(10): 808-814.
- Mitchell, C. H., D. A. Carre, et al. (1998). "A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(12): 7174-7178.
- Mitchell, C. H. and M. M. Civan (1997). "Effects of uncoupling gap junctions between pairs of bovine PE-PE ciliary epithelial cells of the eye." FASEB Journal **11**(A301).
- Mitchell, C. H., K. Peterson-Yantorno, et al. (1999). "A3 adenosine receptors regulate Cl<sup>-</sup> channels of nonpigmented ciliary epithelial cells." The American journal of physiology **276**(3 Pt 1): C659-666.
- Mitchell, C. H., L. Wang, et al. (1997). "A large-conductance chloride channel in pigmented ciliary epithelial cells activated by GTPgammaS." The Journal of membrane biology **158**(2): 167-175.
- Mittag, T. W. and A. Tormay (1985). "Adrenergic receptor subtypes in rabbit iris-ciliary body membranes: classification by radioligand studies." Experimental eye research **40**(2): 239-249.
- Mittag, T. W. and A. Tormay (1985). "Drug responses of adenylate cyclase in iris-ciliary body determined by adenine labelling." Investigative ophthalmology & visual science **26**(3): 396-399.
- Mody, S. M., M. K. Ho, et al. (2000). "Incorporation of Galpha(z)-specific sequence at the carboxyl terminus increases the promiscuity of galpha(16) toward G(i)-coupled receptors." Molecular pharmacology **57**(1): 13-23.
- Moller, M. and F. M. Baeres (2002). "The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland." Cell and tissue research **309**(1): 139-150.
- Mor, M., P. V. Plazzi, et al. (1999). "Melatonin." Current medicinal chemistry **6**(6): 501-518.
- Moreno, M. C., P. Sande, et al. (2005). "Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **19**(9): 1161-1162.
- Morgan, P. J., W. Lawson, et al. (1989). "Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis." Neuroendocrinology **50**(3): 359-362.
- Morris, A. J. and C. C. Malbon (1999). "Physiological regulation of G protein-linked signaling." Physiological reviews **79**(4): 1373-1430.

- Morrison, J. C., Ed. (1989). The Galucomas. Anatomy, microcirculation and ultrastructure of ciliary body. St. Louis, CV Mosby.
- Mullins, U. L. and A. S. Eison (1994). "Pharmacologic characterization of melatonin-mediated phosphoinositide hydrolysis in pigeon brain." Journal of pineal research **17**(1): 33-38.
- Mullins, U. L., P. B. Fernandes, et al. (1997). "Melatonin agonists induce phosphoinositide hydrolysis in *Xenopus laevis* melanophores." Cellular signalling **9**(2): 169-173.
- Murakami, M., M. L. Sears, et al. (1992). "The loci of carbonic anhydrase activity in the ciliary epithelium of the rabbit eye: electrophysiological study with isolated ciliary epithelial bilayer." Acta histochemica Et Citochemica **25**((1-2)): 77-85.
- Nakai, Y., W. L. Dean, et al. (1999). "Genistein inhibits the regulation of active sodium-potassium transport by dopaminergic agonists in nonpigmented ciliary epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **40**(7): 1460-1466.
- Nathanson, J. A. (1980). "Adrenergic regulation of intraocular pressure: identification of beta 2-adrenergic-stimulated adenylate cyclase in ciliary process epithelium." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **77**(12): 7420-7424.
- Nathanson, J. A. (1981). "Human ciliary process adrenergic receptor: pharmacological characterization." Investigative ophthalmology & visual science **21**(6): 798-804.
- Navajas, C., T. Kokkola, et al. (1996). "A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor." European journal of pharmacology **304**(1-3): 173-183.
- New, D. C., S. T. Tsim, et al. (2003). "G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction." Neuro-Signals **12**(2): 59-70.
- Nosjean, O., M. Ferro, et al. (2000). "Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2." The Journal of biological chemistry **275**(40): 31311-31317.
- Nosjean, O., J. P. Nicolas, et al. (2001). "Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2." Biochemical pharmacology **61**(11): 1369-1379.
- Onuki, J., E. A. Almeida, et al. (2005). "Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol." Journal of pineal research **38**(2): 107-115.
- Osborne, N. N. and G. Chidlow (1994). "The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye." Experimental eye research **59**(1): 3-9.
- Osborne, N. N. and G. Chidlow (1996). "Do beta-adrenoceptors and serotonin 5-HT1A receptors have similar functions in the control of intraocular pressure in the rabbit?" Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde **210**(5): 308-314.
- Oxenkrug, G., P. Requintina, et al. (2001). "Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin and melatonin in the in vivo models." Annals of the New York Academy of Sciences **939**: 190-199.

- Pascale, A., F. Drago, et al. (2012). "Protecting the retinal neurons from glaucoma: lowering ocular pressure is not enough." Pharmacological research **66**(1): 19-32.
- Pesin, S. R. and O. A. Candia (1982). "Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> fluxes, and effects of pharmacological agents on the short-circuit current of the isolated rabbit iris-ciliary body." Current eye research **2**(12): 815-827.
- Petit, L., I. Lacroix, et al. (1999). "Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway." Biochemical pharmacology **58**(4): 633-639.
- Peyrot, F., C. Houee-Levin, et al. (2006). "Melatonin nitrosation promoted by NO\*<sub>2</sub>; comparison with the peroxynitrite reaction." Free radical research **40**(9): 910-920.
- Philipp, M., M. Brede, et al. (2002). "Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough." American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology **283**(2): R287-R295.
- Phillips, C. I., G. Howitt, et al. (1967). "Propranolol as ocular hypotensive agent." The British journal of ophthalmology **51**(4): 222-226.
- Piccione, G., C. Giannetto, et al. (2010). "Influence of different artificial lighting regimes on intraocular pressure circadian profile in the dog (*Canis familiaris*)." Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science **59**(2): 215-223.
- Pintor, J., L. Martin, et al. (2001). "Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits." Eur J Pharmacol. **416**(3): 251-254.
- Pintor, J., T. Pelaez, et al. (2003). "Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor." Br J Pharmacol. **138**(5): 831-836.
- Pollack, I. P., B. Becker, et al. (1960). "The effect of hypothermia on aqueous humor dynamics. I. Intraocular pressure and outflow facility of the rabbit eye." American journal of ophthalmology **49**: 1126-1134.
- Popova, J. S. and M. L. Dubocovich (1995). "Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices." Journal of neurochemistry **64**(1): 130-138.
- Potter, D. E., C. E. Crosson, et al. (1990). "Review: alpha 2 and DA2 agonists as antiglaucoma agents: comparative pharmacology and clinical potential." Journal of ocular pharmacology **6**(3): 251-257.
- Pringle, A., M. Bogdanovskaya, et al. (2015). "Does melatonin treatment change emotional processing? Implications for understanding the antidepressant mechanism of agomelatine." Journal of psychopharmacology **29**(10): 1129-1132.
- Quera Salva, M. A., S. Hartley, et al. (2011). "Circadian rhythms, melatonin and depression." Current pharmaceutical design **17**(15): 1459-1470.
- Quigley, H. A. (2011). "Glaucoma." Lancet **377**(9774): 1367-1377.
- Quigley, H. A. and A. T. Broman (2006). "The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020." The British journal of ophthalmology **90**(3): 262-267.
- Radogna, F., P. Sestili, et al. (2009). "Lipoxygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism." Toxicology and applied pharmacology **238**(2): 170-177.

- Raviola, G. (1974). "Effects of paracentesis on the blood-aqueous barrier: an electron microscope study on *Macaca mulatta* using horseradish peroxidase as a tracer." Investigative ophthalmology **13**(11): 828-858.
- Raviola, G. and E. Raviola (1978). "Intercellular junctions in the ciliary epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **17**(10): 958-981.
- Rebecchi, M. J. and S. N. Pentylala (2000). "Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C." Physiological reviews **80**(4): 1291-1335.
- Reiss, G. R. and R. F. Brubaker (1983). "The mechanism of betaxolol, a new ocular hypotensive agent." Ophthalmology **90**(11): 1369-1372.
- Reiss, G. R., D. A. Lee, et al. (1984). "Aqueous humor flow during sleep." Investigative ophthalmology & visual science **25**(6): 776-778.
- Reiter, R. J. (1991). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions." Endocrine reviews **12**(2): 151-180.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, et al. (2003). "Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans." Acta biochimica Polonica **50**(4): 1129-1146.
- Reppert, S. M. (1997). "Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors." Journal of biological rhythms **12**(6): 528-531.
- Reppert, S. M., C. Godson, et al. (1995). "Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(19): 8734-8738.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, et al. (1995). "Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain." Neuron **15**(5): 1003-1015.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, et al. (1994). "Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses." Neuron **13**(5): 1177-1185.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, et al. (1996). "Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes." Trends in pharmacological sciences **17**(3): 100-102.
- Ressmeyer, A. R., J. C. Mayo, et al. (2003). "Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction." Redox report : communications in free radical research **8**(4): 205-213.
- Riley, M. V. (1964). "The Sodium-Potassium-Stimulated Adenosin E Triphosphatase of Rabbit Ciliary Epithelium." Experimental eye research **3**: 76-84.
- Rivara, S., S. Lorenzi, et al. (2005). "Analysis of structure-activity relationships for MT2 selective antagonists by melatonin MT1 and MT2 receptor models." Journal of medicinal chemistry **48**(12): 4049-4060.
- Roca, A. L., C. Godson, et al. (1996). "Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor." Endocrinology **137**(8): 3469-3477.
- Rosenberg, L. F., T. Krupin, et al. (1998). "Combination of systemic acetazolamide and topical dorzolamide in reducing intraocular pressure

- and aqueous humor formation." Ophthalmology **105**(1): 88-92; discussion 92-83.
- Rosenstein, R. E., S. R. Pandi-Perumal, et al. (2010). "Melatonin as a therapeutic tool in ophthalmology: implications for glaucoma and uveitis." Journal of pineal research **49**(1): 1-13.
- Rossetti, L., M. Digiuni, et al. (2015). "Blindness and Glaucoma: A Multicenter Data Review from 7 Academic Eye Clinics." PloS one **10**(8): e0136632.
- Rowland, J. M., D. E. Potter, et al. (1981). "Circadian rhythm in intraocular pressure: a rabbit model." Current eye research **1**(3): 169-173.
- Rozovskaia, S. B. (1964). "[Remission of High Intraocular Pressure Following Prolonged Therapy of Glaucoma with Diamox and Nofurit]." Oftalmologicheskii zhurnal **19**: 412-415.
- Sampaio Lde, F. (2008). "Melatonin inhibitory effect on cAMP accumulation in the chick retina development." International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience **26**(3-4): 277-282.
- Sampaio Lde, F. (2009). "An unexpected effect of 5-MCA-NAT in chick retinal development." International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience **27**(6): 511-515.
- Samples, J. R., G. Krause, et al. (1988). "Effect of melatonin on intraocular pressure." Current eye research **7**(7): 649-653.
- Sanchez-Torres, J., W. Huang, et al. (1999). "Effects of hypotonic swelling on the cellular distribution and expression of pI(Cln) in human nonpigmented ciliary epithelial cells." Current eye research **18**(6): 408-416.
- Santagostino-Barbone, M. G., E. Masoero, et al. (2000). "2-Phenylmelatonin: a partial agonist at enteric melatonin receptors." Pharmacology & toxicology **87**(4): 156-160.
- Schadlu, R., T. L. Maus, et al. (1998). "Comparison of the efficacy of apraclonidine and brimonidine as aqueous suppressants in humans." Archives of ophthalmology **116**(11): 1441-1444.
- Schenker, H. I., M. E. Yablonski, et al. (1981). "Fluorophotometric study of epinephrine and timolol in human subjects." Archives of ophthalmology **99**(7): 1212-1216.
- Schomerus, C. and H. W. Korf (2005). "Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ." Annals of the New York Academy of Sciences **1057**: 372-383.
- Schottenstein, M. S. (1996). Intraocular pressure and tonometry. The glaucomas - basic sciences. S. M. Ritch R, Krupin T. St. Louis, Mosby: 407-428.
- Sears, M. L., E. Yamada, et al. (1991). "The isolated ciliary bilayer is useful for studies of aqueous humor formation." Transactions of the American Ophthalmological Society **89**: 131-152; discussion 152-134.
- Semak, I., M. Naumova, et al. (2005). "A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome C." Biochemistry **44**(26): 9300-9307.
- Serle, J. B., A. J. Stein, et al. (1984). "Corynanthine and aqueous humor dynamics in rabbits and monkeys." Archives of ophthalmology **102**(9): 1385-1388.

- Serle, J. B., R. F. Wang, et al. (2004). "Effect of 5-MCA-NAT, a putative melatonin MT3 receptor agonist, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes." J Glaucoma **13**(5): 385-388.
- Sewerynek, E. (2002). "Melatonin and the cardiovascular system." Neuro endocrinology letters **23 Suppl 1**: 79-83.
- Shaffer, R. N. and J. Hetherington, Jr. (1966). "Anticholinesterase drugs and cataracts." American journal of ophthalmology **62**(4): 613-618.
- Shahidullah, M., A. Mandal, et al. (2014). "Nitric oxide regulation of Na, K-ATPase activity in ocular ciliary epithelium involves Src family kinase." Journal of cellular physiology **229**(3): 343-352.
- Shahidullah, M., G. Wei, et al. (2013). "DIDS inhibits Na-K-ATPase activity in porcine nonpigmented ciliary epithelial cells by a Src family kinase-dependent mechanism." American journal of physiology. Cell physiology **305**(5): C492-501.
- Shahidullah, M. and W. S. Wilson (1997). "Mobilisation of intracellular calcium by P2Y2 receptors in cultured, non-transformed bovine ciliary epithelial cells." Current eye research **16**(10): 1006-1016.
- Shahidullah, M. and W. S. Wilson (1999). "Atriopeptin, sodium azide and cyclic GMP reduce secretion of aqueous humour and inhibit intracellular calcium release in bovine cultured ciliary epithelium." British journal of pharmacology **127**(6): 1438-1446.
- Shahidullah, M., W. S. Wilson, et al. (2003). "Effects of ion transport and channel-blocking drugs on aqueous humor formation in isolated bovine eye." Investigative ophthalmology & visual science **44**(3): 1185-1191.
- Shi, C., S. Barnes, et al. (2002). "Protein tyrosine kinase and protein phosphatase signaling pathways regulate volume-sensitive chloride currents in a nonpigmented ciliary epithelial cell line." Investigative ophthalmology & visual science **43**(5): 1525-1532.
- Shi, C., A. Szczesniak, et al. (2003). "A3 adenosine and CB1 receptors activate a PKC-sensitive Cl<sup>-</sup> current in human nonpigmented ciliary epithelial cells via a G beta gamma-coupled MAPK signaling pathway." British journal of pharmacology **139**(3): 475-486.
- Shiu, S. Y., B. Pang, et al. (2010). "Signal transduction of receptor-mediated antiproliferative action of melatonin on human prostate epithelial cells involves dual activation of Galpha(s) and Galpha(q) proteins." Journal of pineal research **49**(3): 301-311.
- Silva, S. O., M. R. Rodrigues, et al. (2004). "Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release." Journal of neuroimmunology **156**(1-2): 146-152.
- Slaugenaupt, S. A., A. L. Roca, et al. (1995). "Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a)." Genomics **27**(2): 355-357.
- Sly, W. S. and P. Y. Hu (1995). "Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies." Annu Rev Biochem **64**: 375-401.
- Smirnov, A. N. (2001). "Nuclear melatonin receptors." Biochemistry. Biokhimiia **66**(1): 19-26.
- Song, Y. K., C. K. Lee, et al. (2014). "Instability of 24-hour intraocular pressure fluctuation in healthy young subjects: a prospective, cross-sectional study." BMC ophthalmology **14**: 127.

- Spessert, R., E. Layes, et al. (1993). "Adrenergic stimulation of cyclic GMP formation requires NO-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase in rat pinealocytes." Journal of neurochemistry **61**(1): 138-143.
- Srinivasan, V., S. R. Pandi-Perumal, et al. (2006). "Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders." Behavioral and brain functions : **BBF 2**: 15.
- Stein, A., R. Pinke, et al. (1983). "The effect of topically administered carbonic anhydrase inhibitors on aqueous humor dynamics in rabbits." American journal of ophthalmology **95**(2): 222-228.
- Steinhilber, D., M. Brungs, et al. (1995). "The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes." The Journal of biological chemistry **270**(13): 7037-7040.
- Stelling, J. W. and T. J. Jacob (1997). "Functional coupling in bovine ciliary epithelial cells is modulated by carbachol." The American journal of physiology **273**(6 Pt 1): C1876-1881.
- Sterling, D., R. A. Reithmeier, et al. (2001). "A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers." The Journal of biological chemistry **276**(51): 47886-47894.
- Stobrawa, S. M., T. Breiderhoff, et al. (2001). "Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus." Neuron **29**(1): 185-196.
- Stone, R. A. and Y. Kuwayama (1989). The nervous system and intraocular pressure. The Glaucomas. S. M. Ritch R, Krupin T. St. Louis., Mosby: 257-279.
- Tamm, E. R., B. M. Braunger, et al. (2015). "Intraocular Pressure and the Mechanisms Involved in Resistance of the Aqueous Humor Flow in the Trabecular Meshwork Outflow Pathways." Progress in molecular biology and translational science **134**: 301-314.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2001). "N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **15**(12): 2294-2296.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2003). "Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin." Journal of pineal research **34**(1): 75-78.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (1998). "A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation." Biochemical and biophysical research communications **253**(3): 614-620.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (1999). "Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance." Biochimica et biophysica acta **1472**(1-2): 206-214.
- Taussig, R. and A. G. Gilman (1995). "Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases." The Journal of biological chemistry **270**(1): 1-4.
- Therkelsen, D. and W. Quirk (2001). "Glaucoma in the 21st Century: New Ideas, Novel Treatments." Dain Rauscher Wessels.
- Tijmes, M., R. Pedraza, et al. (1996). "Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis." Steroids **61**(2): 65-68.

- To, C. H., C. W. Do, et al. (2001). "Model of ionic transport for bovine ciliary epithelium: effects of acetazolamide and HCO." American journal of physiology. Cell physiology **280**(6): C1521-1530.
- Topper, J. E. and R. F. Brubaker (1985). "Effects of timolol, epinephrine, and acetazolamide on aqueous flow during sleep." Investigative ophthalmology & visual science **26**(10): 1315-1319.
- Tosini, G. (2000). "Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals." Chronobiology international **17**(5): 599-612.
- Tosini, G., A. J. Davidson, et al. (2007). "Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **21**(14): 3866-3871.
- Tosini, G. and C. Fukuhara (2002). "- The mammalian retina as a clock." Cell and tissue research **309**(1): 119-126.
- Tosini, G. and C. Fukuhara (2003). "Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals." Journal of neuroendocrinology **15**(4): 364-369.
- Tsu, R. C., H. W. Lai, et al. (1995). "Differential coupling of the formyl peptide receptor to adenylate cyclase and phospholipase C by the pertussis toxin-insensitive Gz protein." The Biochemical journal **309** ( Pt 1): 331-339.
- Tsu, R. C. and Y. H. Wong (1996). "Gi-mediated stimulation of type II adenylyl cyclase is augmented by Gq-coupled receptor activation and phorbol ester treatment." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **16**(4): 1317-1323.
- Usukura, J., G. L. Fain, et al. (1988). "[<sup>3</sup>H]ouabain localization of Na-K ATPase in the epithelium of rabbit ciliary body pars plicata." Investigative ophthalmology & visual science **29**(4): 606-614.
- Vale, J., A. C. Gibbs, et al. (1972). "Topical propranolol and ocular tension in the human." The British journal of ophthalmology **56**(10): 770-775.
- Vanecek, J. (1998). "Cellular mechanisms of melatonin action." Physiological reviews **78**(3): 687-721.
- Vanecek, J. and L. Vollrath (1989). "Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary." Brain research **505**(1): 157-159.
- Vella, F., G. Ferry, et al. (2005). "NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries." Biochemical pharmacology **71**(1-2): 1-12.
- Vincent, L., W. Cohen, et al. (2010). "Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand." Journal of pineal research **48**(3): 222-229.
- Vollrath, L. (1981). The pineal organ. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. A. Oksche and L. Vollrath. Berlín, Springer. **VII**: 665.
- von Gall, C., J. H. Stehle, et al. (2002). "Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction." Cell and tissue research **309**(1): 151-162.
- Walker, A. M. and E. H. Ellinwood (1933). "Comparison of the chemical composition of aqueous humor, cerebrospinal fluid, lymph, and blood from frogs, higher animals, and man - Reducing substances, inorganic phosphate, uric acid, urea." Journal of Biological Chemistry **101**(1): 269-287.

- Wang, L., L. Chen, et al. (2000). "The role of CIC-3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by antisense inhibition." The Journal of physiology **524 Pt 1**: 63-75.
- Wang, R. F., J. B. Serle, et al. (1991). "MK-507 (L-671,152), a topically active carbonic anhydrase inhibitor, reduces aqueous humor production in monkeys." Archives of ophthalmology **109**(9): 1297-1299.
- Watanabe, T. and Y. Saito (1978). "Characteristics of ion transport across the isolated ciliary epithelium of the toad as studied by electrical measurements." Experimental eye research **27**(2): 215-226.
- Wax, M. B. and P. B. Molinoff (1987). "Distribution and properties of beta-adrenergic receptors in human iris-ciliary body." Investigative ophthalmology & visual science **28**(3): 420-430.
- Webers, C. A., H. J. Beckers, et al. (2008). "Pharmacological management of primary open-angle glaucoma: second-line options and beyond." Drugs & aging **25**(9): 729-759.
- Wess, J. (1993). "Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function." Trends in pharmacological sciences **14**(8): 308-313.
- Wetzel, R. K. and K. J. Sweadner (2001). "Immunocytochemical localization of NaK-ATPase isoforms in the rat and mouse ocular ciliary epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **42**(3): 763-769.
- Wiechmann, A. F., M. J. Vrieze, et al. (2003). "Direct modulation of rod photoreceptor responsiveness through a Mel(1c) melatonin receptor in transgenic *Xenopus laevis* retina." Investigative ophthalmology & visual science **44**(10): 4522-4531.
- Wiechmann, A. F. and C. R. Wirsig-Wiechmann (2001). "Melatonin receptor mRNA and protein expression in *Xenopus laevis* nonpigmented ciliary epithelial cells." Experimental eye research **73**(5): 617-623.
- Wiederholt, M., R. Schafer, et al. (1996). "Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents." German journal of ophthalmology **5**(3): 146-153.
- Wiederholt, M. and J. A. Zadunaisky (1986). "Membrane potentials and intracellular chloride activity in the ciliary body of the shark." Pflugers Archiv : European journal of physiology **407 Suppl 2**: S112-115.
- Wiederholt, M. H., H. Korbmacher, C (1991). Ion transport across the ciliary epithelium: Lessons from cultured cells and proposed role of the carbonic anhydrase. Carbonic anhydrase. F. G. Botré, G. Storey, B.T. London: 232-244.
- Wiesenberg, I., M. Missbach, et al. (1998). "The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling." Restorative neurology and neuroscience **12**(2-3): 143-150.
- Wistrand, P. J., M. Schenholm, et al. (1986). "Carbonic anhydrase isoenzymes CA I and CA II in the human eye." Investigative ophthalmology & visual science **27**(3): 419-428.
- Wolosin, J. M., J. A. Bonanno, et al. (1991). "Bicarbonate transport mechanisms in rabbit ciliary body epithelium." Experimental eye research **52**(4): 397-407.
- Wolosin, J. M., O. A. Candia, et al. (1997). "Effect of heptanol on the short circuit currents of cornea and ciliary body demonstrates rate limiting role of heterocellular gap junctions in active ciliary body transport." Experimental eye research **64**(6): 945-952.

- Wolosin, J. M., M. Chen, et al. (1993). "Separation of the rabbit ciliary body epithelial layers in viable form: identification of differences in bicarbonate transport." Experimental eye research **56**(4): 401-409.
- Wong, Y. H. (1996). The G protein linkage of melatonin receptors. Melatonin: A Universal Photoperiodic Signal with Diverse Actions. P. L. Tang, S. L. Pang and R. J. Reiter. Basel, Krager. **21**: 147-153.
- Wu, Q., N. A. Delamere, et al. (1997). "Membrane-associated carbonic anhydrase in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium." Investigative ophthalmology & visual science **38**(10): 2093-2102.
- Wu, Q., W. M. Pierce, Jr., et al. (1998). "Cytoplasmic pH responses to carbonic anhydrase inhibitors in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium." The Journal of membrane biology **162**(1): 31-38.
- Wu, R., J. Flammer, et al. (2003). "Reduction of nitrite production by endothelin-1 in isolated porcine ciliary processes." Experimental eye research **77**(2): 189-193.
- Yablonski, M. E., T. J. Zimmerman, et al. (1978). "A fluorophotometric study of the effect of topical timolol on aqueous humor dynamics." Experimental eye research **27**(2): 135-142.
- Yamamoto-Mizuma, S., G. X. Wang, et al. (2004). "Altered properties of volume-sensitive osmolyte and anion channels (VSOACs) and membrane protein expression in cardiac and smooth muscle myocytes from *Clcn3*<sup>-/-</sup> mice." The Journal of physiology **557**(Pt 2): 439-456.
- Yantorno, R. E., D. A. Carre, et al. (1992). "Whole cell patch clamping of ciliary epithelial cells during anisotonic swelling." The American journal of physiology **262**(2 Pt 1): C501-509.
- Yeh, J., D. Kravitz, et al. (2008). "Rational use of the fixed combination of dorzolamide - timolol in the management of raised intraocular pressure and glaucoma." Clinical ophthalmology **2**(2): 389-399.
- Yung, L. Y., S. T. Tsim, et al. (1995). "Stimulation of cAMP accumulation by the cloned *Xenopus* melatonin receptor through *G<sub>i</sub>* and *G<sub>z</sub>* proteins." FEBS letters **372**(1): 99-102.
- Zawilska, J. B., A. Lorenc, et al. (2006). "Diurnal and circadian rhythms in melatonin synthesis in the turkey pineal gland and retina." General and comparative endocrinology **145**(2): 162-168.
- Zeuthen, T., A. K. Meinild, et al. (1997). "Water transport by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter under isotonic conditions." Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization **89**(5-6): 307-312.
- Zhang, H., G. L. Squadrito, et al. (1998). "The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products." Biochemical and biophysical research communications **251**(1): 83-87.
- Zhang, H., G. L. Squadrito, et al. (1999). "Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study." Chemical research in toxicology **12**(6): 526-534.
- Zhang, J. J. and T. J. Jacob (1997). "Three different Cl<sup>-</sup> channels in the bovine ciliary epithelium activated by hypotonic stress." The Journal of physiology **499** ( Pt 2): 379-389.
- Zhang, X., R. R. Krishnamoorthy, et al. (2003). "Dexamethasone regulates endothelin-1 and endothelin receptors in human non-pigmented ciliary epithelial (HNPE) cells." Experimental eye research **76**(3): 261-272.

- Zhao, M., J. J. Hejkal, et al. (2010). "Aqueous humor dynamics during the day and night in juvenile and adult rabbits." Investigative ophthalmology & visual science **51**(6): 3145-3151.
- Zimmerman, T. J. (1981). "Pilocarpine." Ophthalmology **88**(1): 85-88.



## *Anexos*

## ANEXOS

El trabajo recogido en esta tesis doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV en la Facultad de Óptica de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección del Prof. Jesus Pintor Just.

El doctorando, D. Fernando Huete Toral, ha sido financiado mediante una Beca de Formación Personal Investigador del programa de I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad, ref BES-2008-009513, asociada al proyecto de investigación SAF2007-60835.

Los datos recogidos en la realización de este proyecto han dado lugar a las publicaciones contenidas en este trabajo y a las siguientes comunicaciones en congresos:

- *Melatonin and 5-MCA-NAT reduce chloride efflux in rabbit ciliary non-pigmented epithelial cells.*  
Fernando Huete Toral, Almudena Crooke, Jesus Pintor  
ARVO 2010, *Travel Grant Santen Pharmaceutical.*
- *5-MCA-NAT reduces carbonic anhydrases expression by means of MT3 melatonin receptors.*  
Asuncion Peral, A. Crooke, F. Huete-Toral, A. Martinez-Aguilar, P. Alarma-Estrany, J. Pintor  
ARVO 2011.
- *Melatonin and its analogue 5-MCA-NAT potentiate the ocular hypotensive effect mediated by adrenergic receptors: significance for glaucoma treatment.*  
Fernando Huete-Toral, Alejandro Martínez-Águila, Alba Martín-Gil, Begoña Fonseca, Jesús Pintor, Almudena Crooke.  
AOPT 2013; *ponencia oral.*

